

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MIRNOMICA DE DISTINTOS ENFOQUES BIOLÓGICOS DE *Aedes aegypti* (L)
(DIPTERA: CULICIDAE)

POR

IRÁM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA

JUNIO, 2018

MIRNOMICA DE DISTINTOS ENFOQUES BIOLÓGICOS DE *Aedes aegypti* (L)
(DIPTERA: CULICIDAE)

Comité de tesis

Dr. Gustavo Ponce-García
Presidente

Dra. Adriana Elizabeth Flores-Suárez
Secretario

Dra. Beatriz López-Monroy
Vocal

Dr. Juan I. Arredondo-Jiménez
Vocal

Dra. Susana Favela-Lara
Vocal

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue desarrollada tanto en el Núcleo de Laboratorios del Jiangsu Engineering Research Center for microRNA Biology and Biotechnology, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing, China, como en el Laboratorio de Entomología Médica del Departamento de Zoología de Invertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, Nuevo León, México.

RETRIBUCIONES

Mi mayor gratitud a la **Dra. Adriana Elizabeth Flores-Suarez** por conducir mis ideas, intelecto y sobretodo el carácter.

Al **Profesor Chen-Yu Zhang (张辰宇)** Jefe del *State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences*, Nanjing, China, por darme una oportunidad de realizar una estancia académica en el laboratorio a su cargo para llevar acabo la parte experimental del Proyecto.

A la **Dra. Laura Elia Martínez-Garza** por confiar en mí y permitirme realizar éste proyecto académico.

Al **Dr. Víctor Manuel Treviño-Alvarado** por discutir los hallazgos en el proyecto y ayudarme a darle sentido a lo descubierto.

A mis compañeros y amigos Hongwei Liang (梁宏伟), Yu Zhou (周榆) y Xi Chen (陈熹).

DEDICATORIA

A mi mamá **Silvia Ruth Sánchez-Sanmiguel** que siempre confió en mí y me dio la libertad de decidir mi camino, respetando mis decisiones por más descabelladas y retorcidas que estas fueran.

A mi papá **Armando Rodríguez-Mercado**.

“Cuantos hombres se precipitan hacia la luz, no para ver mejor, sino para brillar”

Friedrich Wilhelm Nietzsche
(15 de octubre de 1844 – 25 de agosto de 1900)

Subiré al cielo, Por encima de las estrellas de Dios levantaré mi trono, Y me sentaré en el monte de la asamblea, En el extremo norte.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1.	<i>Ae. aegypti</i>	3
2.2.	microRNAs	4
2.3.	Fisiología de los microRNAs	4
2.3.1.	Etapas de vida	4
2.3.2.	Alimentación y digestión	5
2.3.3.	Anatomía corporal	5
2.3.4.	Estímulos externos	5
2.3.5.	Diferenciación sexual o Dimorfismo sexual	5
3	JUSTIFICACIÓN	7
4	HIPÓTESIS	8
5	OBJETIVOS	9
5.1.	General	9
5.2.	Específicos	9
6	MATERIAL Y MÉTODOS	10
6.1.	ESTRATEGIA GENERAL	10
6.2.	Bioespecímenes	10
6.3.	Extracción de microRNAs	11
6.4.	NGS	11
6.5.	Bioinformática	11
6.5.1.	Análisis estadístico	11
6.5.2.	Mapas de calor	11
6.5.3.	Diagrama de Venn	12
6.5.4.	UpSet	12
6.5.5.	Red jerárquica circular	12
6.5.6.	Dendrograma	12
7	RESULTADOS	13
7.1.	Contrastes experimentales	14
7.2.	Abundancia	17
7.2.1.	Distribución por etapa de vida	17
7.2.1.1.	Específicos de huevos en <i>Ae. aegypti</i>	17
7.2.1.2.	Específicos de adultos <i>Ae. aegypti</i>	18
7.2.2.	Distribución por sexo	20
7.2.2.1.	Específicos de machos <i>Ae. aegypti</i>	20
7.2.2.2.	Específicos de hembras de <i>Ae. aegypti</i>	21
7.2.2.3	Específicos de machos y huevos de <i>Ae. aegypti</i>	22
7.2.2.4	Específicos de hembras y huevos	23
7.2.3.	Distribución cronológica de alimentación	24
7.2.4.	microRNAs humanos presentes en <i>Ae. aegypti</i>	25
7.3.	Riqueza biológica	28
7.3.1.	<i>Ae. aegypti</i>	28

7.3.2.	Insecta	29
7.3.3.	Animalia	30
7.3.4.	<i>Ae. aegypti</i> + Insecta	31
7.3.5.	Insecta + Animalia	32
7.3.6.	<i>Ae. aegypti</i> + Insecta + Animalia	33
7.4.	Interacciones	34
7.4.1.	microRNAs cronológicamente expresados	34
7.4.2.	microRNAs por sexo y estadio de vida	36
7.5.	Paralogía y coexpresión	38
8	DISCUSIÓN	44
	microRNAs previamente analizados de manera experimental	
8.1	encontrados en <i>Ae. aegypti</i>	45
8.1.1.	aga-miR-281	45
8.1.2.	miR-989	45
8.1.3.	aae-miR-1890	46
8.1.4.	miR-2940	46
8.1.5.	aae-miR-1174	46
8.1.6.	aae-miR-375	46
8.1.7.	aae-miR-306-5p	47
8.1.8.	ast-miR-14	47
8.1.9.	aal-miR-2946	47
8.1.10.	miR-2943	47
8.1.11.	ast-bantam-3p	47
8.1.12.	aae-miR-2765	48
8.2.	microRNA sobre expresados por condición fisiológica	48
8.2.1.	Hembras	48
8.2.2.	Hembras y huevos	48
8.2.3.	Embrión	49
8.2.4.	Cronología de alimentación	49
8.3.	Transcritos blancos previamente reportados de los microRNA	49
8.3.1.	PLC-epsilon	49
8.3.2.	Tsf2	50
	ATP citrate lyase, Cameo2, cytochrome B5, eIF4A, fusilli isoform G, glycogen synthase, NIPSNAP protein, PAP1, Phe hydroxylase, hypoxia inducible factor 1, Ras-related protein rab-39b-like, SLY-1 homolog, syndecan, UDP-glycosyltransferase denylate cyclase, eIF2A, GP40, isovaleryl CoA dehydrogenase, metal transporter CNNM2 like, peripheral-type benzodiazepine receptor, protein canopy like, synaptic vesicle protein, SSR β subunit	50
8.3.3.		
8.3.4.	ANKRD54, Atg4, Cactus, Draper, ECSIT, Eiger, serpin-4	51
8.3.5.	Optineurin, spätzle, MAP-kinase, Chitotriosidase-1	51
8.3.6.	mse-miR-281	51
8.3.7.	Meiotic 9, Thioredoxin-2 y Aconitase	52
8.4.	Predicción de transcritos diana de los microRNAs deducidos	52
8.4.1.	Yantar (small nuclear ribonucleoprotein 27kDa protein)	52
8.4.2.	CNN (centrosomin)	53
8.4.3.	Odd paired (zinc fingers)	53
8.4.4.	CG31823	53

8.4.5.	CG43737	54
8.4.6.	Cf2 (Chorion factor 2)	54
8.4.7.	Pink1 (PTEN-induced putative kinase 1)	54
8.4.8.	Sur-8	55
8.4.9.	Tudor-SN (Tudor staphylococcal nuclease)	55
8.4.10.	CG15471	56
8.4.11.	PTP-ER (Protein tyrosine phosphatase-ERK/Enhancer of Ras1)	56
8.4.12.	CG15140	56
8.4.13.	Rab35	57
8.4.14.	Klumpfuss	57
8.4.15.	zfh1 (Zn finger homeodomain 1)	57
8.4.16.	Brummer	58
8.4.17.	Cp36 (Chorion protein 36)	58
8.4.18.	Dop1R1 (Dopamine 1-like receptor 1)	58
8.4.19.	CG13713	58
8.4.20.	CG31190 (Down syndrome cell adhesion molecule 3)	59
8.5.	Transmisión vertical	59
9	CONCLUSIONES	60
10	PERSPECTIVAS	61
11	BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Inventario de microRNAs reportados para la clase Insecta.	6
Tabla 2.	Extracto y categorización de las lecturas de los microRNAs obtenidas por secuenciación de nueva generación.	13
Tabla 3.	Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de huevos.	17
Tabla 4.	Relación de microRNAs previamente reportados presentes en adultos (conservados entre hembras y huevos).	19
Tabla 5.	Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de machos.	20
Tabla 6.	Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de hembras.	21
Tabla 7.	Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre machos y huevos.	22
Tabla 8.	Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos.	23
Tabla 9.	Relación de microRNAs previamente reportados presentes a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.	24
Tabla 10.	Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos.	26
Tabla 11.	Relación de microRNAs dada por ortología y homología.	27
Tabla 12.	Relación de microRNAs previamente reportados para la clase Insecta y <i>De Novo</i> para <i>Ae. aegypti</i> .	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estrategia general el proyecto.	10
	Enfoque analítico integral sobre microRNAs previamente reportados para Animalia con excepción de Insecta presentes en <i>Ae. aegypti</i> (huevos + macho + hembra).	14
Figura 2.	Enfoque analítico integral sobre microRNAs previamente reportados para Insecta presentes en <i>Ae. aegypti</i> (huevos + macho + hembra).	14
Figura 3.	Contraste de la expresión diferencial de la expresión de los microRNAs entre machos y hembras.	15
Figura 4.	Comparación de la firma mirnómica entre huevos y adultos.	15
Figura 5.	Análisis para la determinación del patrón cronológico de expresión correlacionado con la ingesta y digestión de sangre.	16
Figura 6.	Categorización de microRNAs previamente reportados y encontrados en nuestros resultados.	16
Figura 7.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de huevos en el contraste hecho contra hembras y machos.	17
Figura 8.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados exclusivos de adultos (expresados entre hembras y machos).	18
Figura 9.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de machos en el contraste hecho contra hembras y huevos.	20
Figura 10.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de hembras en el contraste hecho contra machos y huevos.	21
Figura 11.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y conservados entre machos y huevos en el contraste hecho contra hembras.	22
Figura 12.	Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos en el contraste hecho contra machos.	23
Figura 13.	Mapa de calor con los microRNAs previamente reportados en el reino Animalia con expresión exclusivos a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.	24
Figura 14.	Mapa de calor con los microRNAs previamente reportados en el reino Animalia con expresión exclusivos a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.	25
Figura 15.	Diagrama de Venn de microRNAs encontrados en nuestros resultados previamente reportados para <i>Ae. aegypti</i> .	28
Figura 16.	Diagrama de Venn de microRNAs reportados previamente en Insecta (no <i>Ae. aegypti</i> y encontrados en nuestros resultados).	29
Figura 17.	Diagrama de Venn de microRNAs encontrados en nuestros resultados previamente reportados para Animalia.	30
Figura 18.	Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en <i>Ae. aegypti</i> e Insecta y encontrados en nuestros resultados.	31
Figura 19.	Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en Insecta y Animalia encontrados en nuestros resultados.	32
Figura 20.	Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en Insecta y Animalia y también en <i>Ae. aegypti</i> encontrados en nuestros resultados.	33
Figura 21.		

Figura 22.	Interactoma de coexpresión dada cronológicamente relativa a la alimentación.	35
Figura 23.	Interactoma de expresión independiente dada para hembras, machos, adultos, embriones.	37
Figura 24.	Diagrama UpSet que demuestra la interacción de los microRNAs <i>De Novo</i> para <i>Ae. aegypti</i> previamente reportado en otros organismos de la clase Insecta.	38
Figura 25.	Interacciones (líneas) que presenta cada microRNA predicho (nodos) de acuerdo a su igualdad por su código de clasificación numérica. Cada nodo esta coloreado acorde a la especie en la cual fue encontrado el microRNA.	41
Figura 26.	Dendrograma de los organismos donde los microRNAs encontrados <i>De Novo</i> en <i>Ae. aegypti</i>	42
Figura 27.	SunBurst de los blancos (confirmados experimentalmente y predichos In Silico) de los microRNAs encontrados tanto <i>De Novo</i> para <i>Ae. aegypti</i> como previamente reportados en organismos de la Clase Insecta.	44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Acetilcolina.	ACH
Ácido Clorhídrico.	HCl
Ácido desoxirribonucleico complementario.	DNAc
Ácido desoxirribonucleico de cadena doble complementaria.	DNAcdc
Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla complementaria.	DNAcsc
Ácido desoxirribonucleico genómico.	DNAg
Ácido desoxirribonucleico.	DNA
Ácido etilen-diamino-tetracético.	EDTA
Ácido ribonucleico.	RNA
Adenosín trifosfato.	ATP
Agua.	H ₂ O
Aminoácidos.	Aa
ARN antisentido.	RNAa
ARN de cadena sencilla.	RNAss
ARN de doble cadena.	RNAdc
ARN mensajero.	RNAm
bases.	B
Calcio.	Ca ²⁺
Cambios no sinónimos.	Dn
Cambios sinónimos.	Ds
Cloruro de Calcio.	CaCl
Cloruro de Magnesio.	MgCl ₂
Cloruro de Potasio.	KCl
Cloruro de Sodio.	NaCl
Daltones.	Da
Delta-cycle threshold	ΔCt
Delta-delta-cycle threshold	ΔΔCt
Deoxi citidina trifosfato.	dCTP
Desoxi guanosina trifosfato.	dGTP
Desoxi timidina trifosfato.	dTTP
Desoxi adenosina trifosfato.	dATP
Desoxinucleótidos trifosfato.	dNTPs
Desviación estándar.	DeEs
Dietilpirocarbonato.	DEPC
Dodecyl sulfato de sodio.	SDS
Expressed Sequence Tag.	EST
Factores de transcripción.	FT
Grados centígrados.	°C
Gramos.	G
Hidróxido de Sodio.	NaOH
Homo sapiens.	Hs
Horas.	H
Identificación.	ID
Índice de masa corporal.	IMC
Kilo Daltones.	KDa
Kilo pares de bases	Kpb
Kilo voltios	KV

Kilo.	K
Magnesio.	Mg ²⁺
Marcador de peso molecular.	MPM
Micro Faradios	μF
Micro litro.	μL
Micro molar.	μM
Microarreglo.	Ma
Microgramo.	μg
microRNA.	miRNA
Mili molar.	Mm
Mililitro.	ML
Milímetros.	Mm
Minutos.	Min
Molar.	M
Nano gramos.	Ng
Nanómetro.	Nm
Nucleotidil difosfato.	NDP
Nucleotidil trifosfato.	NTP
Nucleótidos.	Nt
Ohms.	Ω
Pares de bases.	Pb
RNA asociados a Piwi.	piRNA
Potasio.	K
Potencial de hidrogeno.	Ph
Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa.	qPCR
Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final.	PCR
Revoluciones por minuto.	Rpm
RNA de transferencia.	RNA _t
RNA ribosomal.	RNA _r
Segundos.	Seg
Sitio de unión al factor de transcripción	SUFT
Sodio.	Na ⁺
Solución de Buffer de Fosfatos.	PBS
Temperatura de alineamiento.	Tm
<i>Termofilus aquaticus</i> .	Taq
Transcriptasa Reversa.	RT
Tris-ácido acético-EDTA.	TAE
Tris-Borato-EDTA.	TBE
Tris-EDTA.	TE
Ultravioleta.	UV
Unidades de actividad enzimática.	U
Unidades Svedberg.	#S
Voltios.	V

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs endógenos de una sola hebra con una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos y estos regulan la traducción de proteínas mediante el bloqueo de la hibridación con los RNA mensajeros. A la fecha se ha reportado su existencia y rol fisiológico en organismos de todos los reinos. Los microRNAs participan desempeñando múltiples y variadas funciones. A la fecha se han demostrado que los miARN en mosquitos juegan importantes roles en diversos procesos biológicos como la digestión sanguínea, la ovoposición, la diferenciación sexual, la resistencia a insecticidas y la infección con patógenos. Hasta el momento se han reportado microRNAs de 33 especies de insectos dentro de la base de datos miRBase, sumando un total de 3,857 microRNAs. En el presente trabajo se describe la batería de microRNAs con expresión exclusiva de diversos enfoques biológicos que tuvieran al menos 10 lecturas de presencia y 5 escalas de diferencia. Ahora conocemos microRNAs con expresión exclusiva en machos (10), hembras (7), adultos (45), huevos (13), hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 (11), 48 y 72 horas. En el presente estudio se reporta por primera vez la huella dactilar mirnómica de diversos enfoques biológicos [etapas de vida (huevos y adultos), sexo (machos y hembras) y la cronología postprandial (0, 24, 48 y 72 horas posteriores a la alimentación)] de *Ae. aegypti*. El patrón diferencial de la expresión de los miRNAs específico y compartido en etapas de vida desempeña un rol crítico en la fisiología de *Ae. aegypti*. Una mejor comprensión de las funciones de estos miRNAs tendrá una gran implicación para el control efectivo de la población de vectores y, por lo tanto, para interrumpir la transmisión de enfermedades provocadas por patógenos como los virus Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro y Sepik.

ABSTRACT

The microRNAs (miRNAs) are small single-stranded endogenous RNAs with a length between 21 and 25 nucleotides and these regulate the translation of proteins by hybridization with messenger RNAs. To date, its existence and physiological role have been reported in organisms of all kingdoms. The microRNAs participate by performing multiple and varied functions. To date, it has been shown that miRNAs in mosquitoes play important roles in various biological processes such as blood digestion, oviposition, sexual differentiation, resistance to insecticides and infection with pathogens. At this moment, microRNAs from 33 insect species have been reported in the miRBase database, with a total of 3,857 microRNAs. In this work we describe the battery of microRNAs with exclusive expression of diverse biological approaches that had at least 10 reads and 5 folds of presence. Now we know microRNAs with an exclusive expression in males (10), females (7), adults (45), eggs (13), females fed and sacrificed at 24 (11), 48 and 72 hours. In the present study we report for the first time the mirnomic fingerprint of diverse biological approaches [life stages (eggs and adults), sex (males and females) and the postprandial chronology (0, 24, 48 and 72 hours after feeding)] of *Ae. aegypti*. The differential expression pattern of the miRNAs specific and shared in stages of life plays a critical role in the physiology of *Ae. aegypti*. A better understanding of the functions of these miRNAs will have a great implication for the effective control of the population of vectors and, therefore, to interrupt the transmission of diseases caused by pathogens such as Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro and Sepik viruses.

1. INTRODUCCIÓN

En América, hay un total de 225 especies pertenecientes a la familia Culicidae (Talaga, Murienne et al., 2015) de los cuales aproximadamente 15% son antropofágicas, dentro de las cuales se encuentran las especies del género *Aedes*. *Aedes aegypti* (L), es uno de los principales mosquitos vectores de enfermedades transmitidas a humanos como los son fiebre amarilla, el dengue, zika y chikungunya, afectando entre 50 y 100 millones de personas anualmente, así también más de 2,500 millones de personas viven en zonas endémicas del vector (OMS, 2018), los patógenos transmitidos por *Ae. aegypti* como la fiebre amarilla, el Dengue, Zika y Chikungunya. Estas afecciones promueven el estudio y ahondo en los mecanismos que orquestan la fisiología de *Ae. aegypti*, por lo cual el comprender los variados mecanismos bioquímicos que con sincronización dan como resultado fenotipos específicos promulgan propuestas alternas de control; uno de los mecanismos es la regulación realizada por moléculas conocidas como microRNAs que son moléculas con una extensión de entre 22 y 25 nt no codificantes que actúan como reguladores postranscripcionales, estos ácidos nucleicos pueden interactuar con múltiples genes diana/blanco para desencadenar o impedir funciones biológicas específicas, sin embargo, a la fecha la caracterización y la función de los microRNAs y sus mensajeros blancos potenciales no se han determinado completamente.

La caracterización de los microRNAs se ha explorado de manera parcial en insectos. Actualmente existen reporte de microRNAs de 33 organismos de la clase Insecta, que dan un total de 3,857 microRNAs reportados, de los cuales 155 son de *Ae. Aegypti* (Feng, Zhou et al., 2018; W. Liu, Hao et al., 2017) y solo a un grupo se les ha determinado su blanco así como su función biológica, que esta última va desde la alimentación, la inmunidad y el desarrollo, resistencia a insecticidas, determinación de sexo, etapa de vida, infección por patógenos, etc. Algunos estudios sugieren que la expresión de microRNAs en *Anopheles gambiae* (Biryukova, Ye et al., 2014; HoltSubramanian et al., 2002; Winter, Edaye et al., 2007), *Anopheles stephens* (Dritsou, Deligianni et al., 2014; Jain, Rana et al., 2014; Jain, Rana et al., 2015; Valenzuela, Francischetti et al., 2003), *Culex quinquefasciatus* (Lei, Lv et al., 2015) y *Aedes albopictus* (Puthiyakunnon, Yao et al., 2013; Yan, Zhou et al., 2014) desempeñan funciones relacionadas con el desarrollo ovárico, la digestión sanguínea y la inmunidad contra infecciones, sin embargo, los microRNAs se han visto involucrados en procesos fisiológicos en *Ae. aegypti* como funciones intestinales

(absorción de azúcar, digestión sanguínea y la excreción de líquidos) (Bryant, Macdonald et al., 2010; W. Liu, Huang et al., 2014), etapas de vida (desarrollo pupal y maduración de huevos) (Hu, Criscione et al., 2015; Lucas, Zhao et al., 2015; Mead y Tu, 2008; Y. Zhang, Zhao et al., 2016), diferenciación sexual (Hu et al., 2015; S. Li, Mead et al., 2009; W. Liu et al., 2014; Mead y Tu, 2008), arquitectura de la anatomía (desarrollo de intestino medio y ovárico, cuerpo graso vitelogénico) (Bryant et al., 2010; Hussain, Walker et al., 2013; S. Li et al., 2009; Slonchak, Hussain et al., 2014; G. Zhang, Hussain et al., 2013), infección por patógenos (replicación de arbovirus y proliferación de *Wolbachia*) (Maharaj, Widen et al., 2015; Osei-Amo, Hussain et al., 2012). Todos estos descubrimientos han sido posibles mediante la utilización de tecnologías de secuenciación de nueva generación, en el 2017 Dubey SK y colaboradores utilizando la técnica antes mencionada descubrieron que los arbovirus cuando se replican dentro del huésped activan la respuesta inmune innata (Dubey, Shrinet et al., 2017), por otro lado, Mayoral JG y colaboradores en el 2014 mediante secuenciación de nueva generación evidenciaron en una línea celular de mosquito de *Ae. aegypti* el perfil diferencial de microRNAs consecuencia de la infección por *Wolbachia*, evidenciando la interacción entre huésped y patógeno (Mayoral, Etebari et al., 2014), Hussain M en 2014 comprobaron con la utilización de secuenciación de nueva generación que existen microRNAs de *Ae. aegypti* que modulan la replicación viral (Hussain y Asgari, 2014), y en el 2015 Wu Y y colaboradores (Wu, Xie et al., 2015) después de un exhaustivo metaanálisis de la literatura concluyeron que la secuenciación de nueva generación resulta ser una herramienta útil para los análisis funcionales de los microRNAs en las insectos, y utilizando esta técnica se pueden explorar las bases moleculares de los mosquitos mediante la deducción de conservadas y nuevas moléculas tipo microRNAs (Wu et al., 2015) a la fecha no existe un análisis global que describa los perfiles de expresión de microRNAs exclusivos de etapa da vida, sexo, y postprandial. Por lo anterior, conocer las huellas digitales de los microRNAs en distintos enfoques fisiológicos del mosquito *Ae. aegypti* generará información que apoye en comprender los mecanismos moleculares y genéticos que determinan la variabilidad en la eficiencia de transmisión y la susceptibilidad de los insectos puede ayudar con la propuesta de nuevas estrategias de control de vectores. El proyecto planteado aparte de generar información básica esencial sobre la fisiología de diversos enfoques analíticos también abre posibilidades para el planteamiento de nuevas y vanguardistas estrategias de control.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Ae. aegypti*

Los artrópodos vectores de enfermedades son una problemática de importancia nacional y nacional, específicamente los insectos hematófagos tienen importancia económica y médica para el humano, pues algunos de ellos transmiten enfermedades que se traducen en pérdidas económicas por muertes, tratamientos médicos, incapacidades laborales, medidas de control y una baja en el sector turístico, entre otros impactos negativos. De entre los principales insectos hematófagos se destacan los mosquitos del Orden Díptera, particularmente los incluidos en las familias Culicidae, *Psychodidae*, *Simuliidae* y *Ceratopogonidae* (Dantas-Torres, Cameron et al., 2014). Los mosquitos de la familia *Culicidae* representan una de las principales amenazas en salud pública, debido a la cantidad de enfermedades que transmiten al hombre (Spielman, 1971). En América, de un total de 195 especies de esta familia, aproximadamente el 15% son hematófagas con preferencia por huéspedes humanos y de este número, siete especies son vectores primarios de enfermedades, tales como el virus del Mayaro (MAYV), el virus del dengue (DENV), el virus de Chikungunya (CHIKV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de virus Sepik (SEPV) y el virus de ZIKA (ZIKV). Estos virus son transmitidos por la picadura del mosquito *Ae. aegypti*, y que actualmente se denominan en conjunto como enfermedades transmitidas por *Aedes* o *Aedes-borne-diseases* (ABD por sus siglas en inglés), estas arbovirosis afectan al ser humano y representan pérdidas millonarias para los sistemas de salud. De acuerdo a la organización panamericana de la salud (PAHO) desde el 2014 al presente año se han registrado 6, 382,084 casos de enfermedades arbovirales, Chikungunya y Zika han acumulado 925,462 y 220,693 casos respectivamente, en México del año 2014 al presente la secretaria de salud ha reportado 80,772 casos de dengue, 12,503 de chikungunya y 8,600 casos de Zika. El punto clave de la propagación de estos tipos de virus son los mosquitos trasmisores, por lo que la prevención y el control de la enfermedad va dirigida hacia la búsqueda de nuevas alternativas y la generación de información acerca de la relación hospedero-vector (Dantas-Torres et al., 2014).

2.2. microRNAs

Los microRNAs son RNAs no codificantes de cadena sencilla de aproximadamente 19-25 nt de longitud que regulan de manera negativa la síntesis de proteínas, en la mayoría de los sistemas celulares, esto a través de su interacción con la región posterior a la fase de lectura abierta de los genes o 3'UTR de los RNAs (RNAs mensajeros) claves de dicha síntesis. Los RNAs se derivan a partir de precursores de RNA de doble cadena (dsRNA largos), conocidos como pre-microRNAs, los cuales son sintetizados en el núcleo a través de la RNA polimerasa II y procesados en el citoplasma por complejos enzimáticos, dando lugar a las moléculas maduras (Biryukova et al., 2014).

2.3. Fisiología de los microRNAs

Los microRNAs desempeñan papeles esenciales en diversos procesos fisiológicos tanto en eventos favorables como desfavorables, dichos procesos van desde los perfiles mirnómicos asociados a la presencia de agentes químicos, infección por microorganismos y virus, la biología del desarrollo, la diferenciación sexual, respuesta a estímulos externos, etc. Estas moléculas regulan el silenciamiento post-transcripcional de un 60% de los genes codificantes de proteínas, convirtiendo a este mecanismo en uno de los más importantes de regulación génica (S. Li et al., 2009).

Los microRNAs se han reportados en todos los filums, incluyendo en la clase Insecta (Tabla 1) del filo animalia atribuyéndosele la participación en diversos procesos fisiológicos.

2.3.1. Etapas de vida

A la fecha existen múltiples reportes de microRNAs relacionados con el desarrollo embrionario (Rosa y Brivanlou, 2017), la apoptosis, proliferación celular (Ling, Kokoza et al., 2017), procesos neuronales, vías de señalización celular y control de transposición, entre otros procesos (Lucas et al., 2015), por dar ejemplos se sabe que el aae-miR-1890 (Lucas et al., 2015) participan en el desarrollo y maduración de huevos junto con los microRNAs aae-miR-2943 y aae-miR-2945 (Hu et al., 2015) y a los aae-miR-275 junto con el aae-miR-bantam y aae-miR-8 se le ha atribuido participación durante el período pupal (Lucas et al., 2015).

2.3.2. Alimentación y digestión

En 2010 se reportó y evidenció la función de microRNAs aae-miR-1174 en el mosquito *Ae. aegypti* (W. Liu et al., 2014), específicamente regulando funciones intestinales relacionadas con la absorción de azúcar y la excreción de líquidos, además junto con el aae-miR-1890 (Lucas et al., 2015), el aae-miR-275 (Bryant et al., 2010) y el aae-miR-1890 (Lucas et al., 2015) participan en la ingesta y digestión sanguínea (Bryant et al., 2010; S. Liu, Lucas et al., 2014; W. Liu et al., 2017; Zhao, Lucas et al., 2017).

2.3.3. Anatomía corporal

Los microRNAs aae-miR-281, aae-miR-1174 y aae-miR-1175 se han encontrado expresados de manera específica en intestino medio (S. Li et al., 2009), el aae-miR2-940-5p (Slonchak et al., 2014; G. Zhang et al., 2013), los microRNAs aal-mir-8 y aal-mir-125 se expresaron en glándulas salivales, por otra parte los aae-mir-281-2-5p, aae-mir-281, aae-mir-2940, aae-mir-bantam y aae-mir-263a se expresan en glándulas salivales de mosquitos infectados con arbovirus (Maharaj et al., 2015) y los microRNAs aae-miR-8, aae-miR14, y aae-miR-275 se expresaron en el cuerpo graso vitelogénico (Bryant et al., 2010; Slonchak et al., 2014).

2.3.4. Estímulos externos

Hay distintos reportes de microRNAs relacionados con estímulos externos, tales como los relacionados con la replicación viral (Y. Zhou, Liu et al., 2014) como los relacionados con la inhibición de la replicación como el aae-miR375 (Hussain et al., 2013); el aae-miR-12 (Osei-Amo et al., 2012) que está relacionado con la proliferación de *Wolbachia*. También hay reportes de microRNAs de insectos relacionados con estímulos externos como respuesta a estrés (Jain, Rana, et al., 2015) e insecticidas.

2.3.5. Diferenciación sexual o Dimorfismo sexual

Existen reportes donde se les atribuye un rol esencial a microRNAs en los procesos de diferenciación sexual (Y. Zhang et al., 2016), el aae-miR-309 y el aae-miR-989 participan en el desarrollo de ovarios (Mead y Tu, 2008; Y. Zhang et al., 2016), el aae-miR-989 (S. Li et al., 2009; Mead y Tu, 2008) se encontró sobre expresado de manera específica en hembras y los aae-miR-1891(Hu et al., 2015), aae-miR-184 y aae-miR-1000 en machos (S. Li et al., 2009).

Tabla 1. Inventario de microRNAs reportados para la clase Insecta.

Orden	Genero	Especie	# de microRNAs
Diptera	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	155
	<i>Anopheles</i>	<i>gambiae</i>	130
	<i>Culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	74
	<i>Drosophila</i>	<i>ananassae</i>	76
		<i>erecta</i>	101
		<i>grimshawi</i>	82
		<i>melanogaster</i>	258
		<i>mojavensis</i>	71
		<i>persimilis</i>	75
		<i>pseudoobscura</i>	210
		<i>sechellia</i>	103
		<i>simulans</i>	148
		<i>virilis</i>	180
		<i>willistoni</i>	77
		<i>yakuba</i>	89
	<i>Bactrocera</i>	<i>dorsalis</i>	80
Hymenoptera	<i>Apis</i>	<i>mellifera</i>	254
	<i>Dinoponera</i>	<i>quadricaps</i>	102
	<i>Nasonia</i>	<i>giraulti</i>	32
		<i>longicornis</i>	28
		<i>vitripennis</i>	53
	<i>Polistes</i>	<i>canadensis</i>	73
Lepidoptera	<i>Biston</i>	<i>betularia</i>	2
	<i>Bombyx</i>	<i>mori</i>	487
	<i>Heliconius</i>	<i>melpomene</i>	92
	<i>Manduca</i>	<i>sexta</i>	98
	<i>Plutella</i>	<i>xylostella</i>	133
	<i>Spodoptera</i>	<i>frugiperda</i>	122
Homoptera	<i>Acyrtosiphon</i>	<i>pisum</i>	123
Orthoptera	<i>Locusta</i>	<i>migratoria</i>	7
Coleoptera	<i>Tribolium</i>	<i>castaneum</i>	342

3. JUSTIFICACIÓN

La problemática de los mosquitos vectores de enfermedades es un inconveniente creciente y las estrategias de control cada vez son menos efectivas, esto debido a la mala implementación de programas de control, el desarrollo de resistencia a insecticidas, el impacto negativo a especies de importancia ecológica y la contaminación ambiental, entre otras.

A la fecha, la huella mirnómica de las distintas etapas de vida de *Ae. aegypti* no se conocen, y determinarla, además de generar información biológica esencial sobre la fisiología de las etapas exploradas, también esta información permitirá proponer estrategias de control efectivo y dirigido.

4. HIPÓTESIS

Existen huellas específicas de microRNAs en las distintas etapas biológicas de *Ae. aegypti*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Develar una red de interacciones de microRNAs entre distintos enfoques biológicos de *Ae. aegypti*

5.2. Específicos

- 1.** Determinar el perfil mirnómico en huevos, machos y hembras (0, 24, 48, 72 post alimentación) de *Ae. aegypti*.
- 2.** Minar los datos para:
 - A.** Descubrir nuevos microRNAs de *Ae. aegypti*.
 - B.** Conocer cuáles son los microRNAs de *Ae. aegypti* conservados con otros insectos.
 - C.** Develar los microRNAs de *Ae. aegypti* conservados con otros animales no insectos.
 - D.** Determinar la interacción de los microRNAs entre los enfoques explorados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia general del proyecto consistió obtener el miRNoma de distintos enfoques biológicos; para obtener el material biológico requerido se alimentaron hembras de *Ae. aegypti* de la cepa New Orleans con sangre humana para promover la ovoposición en papeles filtro, las papeletas con los huevos se repartieron en 2 segmentos, uno de los segmentos de papeleta con huevos se puso a eclosionar y los bioespecímenes emergidos se esperaron en machos y hembras, estas últimas se separaron en 2 grupos nuevamente, uno de los grupos se alimentó con sangre humana y se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas, a partir de este material biológico se extrajo el RNA total y se secuenció la fracción correspondiente microRNAs por secuenciación de nueva generación (Figura 1).

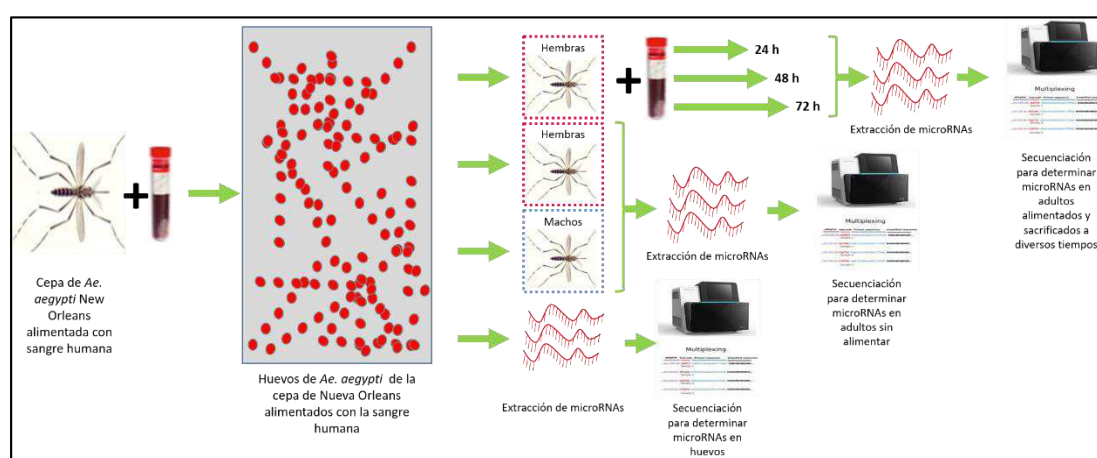


Figura 1. Estrategia general el proyecto.

En total se tuvieron viales con material biológico correspondiente a: huevos, machos, hembras sin alimentar, hembras alimentadas y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas, de estos bioespecímenes se extrajo el RNA total y ese se envió a secuenciar, específicamente secuenciar la fracción correspondiente a los microRNAs.

6.2. Bioespecímenes

Para la realización del proyecto se utilizó una cepa (New Orleans) de laboratorio de *Ae. aegypti* que se ha mantenido en el insectario del Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, esta cepa tiene la particularidad de que no ha sido sometida a ningún tipo de

presión biológica. Las larvas fueron alimentadas con una solución de hígado en polvo al 50%. Todo bajo condiciones controladas de temperatura ($25\text{ C} \pm 2\text{ C}$), humedad relativa ($70\% \pm 2\%$) y fotoperiodo (12:12), una vez que alcanzaron el estadio de pupas se colocaron en jaulas para la emergencia de los adultos. Las hembras se alimentarán una sola vez con sangre humana utilizando un alimentador de membrana artificial.

6.3. Extracción de microRNAs

De los bioespecímenes se extrajeron los microRNAs con el estuche comercial miRNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue tratado con RQ1 DNase durante 15 minutos a 37°C para eliminar trazas de DNA. La pureza y la integridad del RNA se evaluarán utilizando métodos estándares de espectrofotometría y electroforesis en gel, respectivamente.

6.4. NGS

Las muestras que obtuvieron la calidad y la cantidad requerida fueron enviadas a la empresa BGI para determinar la fracción de los RNAs pequeños.

6.5. Bioinformática

De los datos obtenidos por NGS producto de los tratamientos previamente mencionados (Figura 1) fueron minados utilizando herramientas y aplicaciones bioinformáticas que a continuación se describen:

6.5.1. Análisis estadístico

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y para el estudio de cuantificación se determinarán la respectiva media y la desviación estándar. Considerando estadísticamente significativo un resultado con un valor de $p < 0.05$ por el método t de student. Todos los datos fueron sometidos al análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de las comparaciones por pares post hoc HSD de Tukey.

6.5.2. Mapas de calor

Los mapas de calor se realizaron con la finalidad de visualizar de manera concreta la variabilidad de la expresión de los microRNAs en cada uno del enfoque experimentales.

6.5.3. Diagrama de Venn

Para visualizar la especificidad y expresión entre enfoques experimentales se realizaron utilizando diagramas de Venn.

6.5.4. UpSet

Con el fin de mostrar cuantos tipos de microRNAs *De Novo* se compartían entre especies de la clase Insecta y que grupos de especies los compartían se realizó una gráfica UpSet para poder cuantificar e identificar este tipo de relaciones. Se utilizaron los datos purificados de los microRNAs (mayores a 10 reads) para la clase Insecta y que no hubiesen sido reportados previamente para *Ae. aegypti*, estos datos fueron agrupados correspondiendo a la conservación genética que presentaban dentro de las especies obtenidas mediante subgrupos de una lista en R. Una vez acomodadas en una lista que contuviese a todas las especies y sus microRNAs se prosiguió alimentar a la herramienta grafica de R UpSetR con los datos.

6.5.5. Red jerárquica circular

Con el propósito de presentar las interacciones entre los microRNAs predichos en la clase Insecta de manera integral se optó por la formación de una red jerárquica circular. Se partió de los datos purificados para la clase Insecta y a partir de estos datos se formaron tres archivos: 1.- Jerarquía, donde se definió cada microRNA y a que especie pertenecía, 2.- Nombres, donde se presentaron todos los elementos que componían la interacción, 3.- Conexiones, se presentaron las interacciones posibles para cada microRNA. Partiendo de estos archivos se generó el grafico de interacción circular, éstos utilizando las herramientas de R (Dessau y Pipper, 2008): igraph (Csardi, Kutalik et al., 2010; Isci, Dogan et al., 2014), ggraph, Tidyverse (Riemondy, Sheridan et al., 2017), RcolorBrewer (Ramasamy, Ramasamy et al., 2014).

6.5.6. Dendrograma

Se recolecto la información taxonómica para cada especie identificada en las predicciones anteriores promedio de la plataforma de taxonomía presente en la base de datos de NCBI. Estos datos fueron sometidos a una matriz por medio del programa Mesquite v.3.51 (Maddison, Swofford et al., 1997) y obtenido un dendrograma correspondiente a las relaciones generados por la matriz.

7. RESULTADOS

Distintos números de lecturas como resultado de la determinación por secuenciación de nueva generación de cada uno de los enfoques experimentales fueron obtenidas (Tabla 2).

Tabla 2. Extracto y categorización de las lecturas de los microRNAs obtenidas por secuenciación de nueva generación.

Muestra	Total de lecturas	# de lecturas que alinearon con microRNAs reportados previamente	# de microRNAs reportados previamente donde alinearon las lecturas	Lecturas no alineadas	Lecturas alineadas una vez	Lecturas alineadas más d una vez
Machos sin alimentar	2,584,901	4,703/0.18%	415	533,432 /20.64%	1,166,031 /45.11%	885,438 /34.25%
Hembras sin alimentar	2,930,220	4,382/0.15%	368	462,162 /15.77%	1,201,580 /41.01%	1,266,478 /43.22%
Hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 h posteriores a la alimentación	3,146,685	4,451/0.14%	814	536,399 /17.05%	1,087,998 /34.58%	1,522,288 /48.38%
Hembras alimentadas y sacrificadas a las 48 h posteriores a la alimentación	2,992,370	4,155/0.14%	452	509,149 /17.01%	1,110,028 /37.10%	1,373,193 /45.89%
Hembras alimentadas y sacrificadas a las 72 h posteriores a la alimentación	3,061,808	3,029/0.09%	372	556,718 /18.18%	1,173,126 /38.31%	1,331,964 /43.50%
Huevos	1,638,376	4,030/0.25%	372	260,291 /15.89%	540,656 /33.00%	837,429 /51.11%

El criterio del análisis de resultados consistió en utilizar al menos microRNAs con 5 lecturas y que estuvieran al menos 5 veces diferencialmente expresados.

7.1. Contrastes experimentales

Los microRNAs previamente publicados para la Reino Animalia (excepto la clase Insecta) fueron buscados en nuestros resultados de secuenciación de nueva generación (Figura 2).

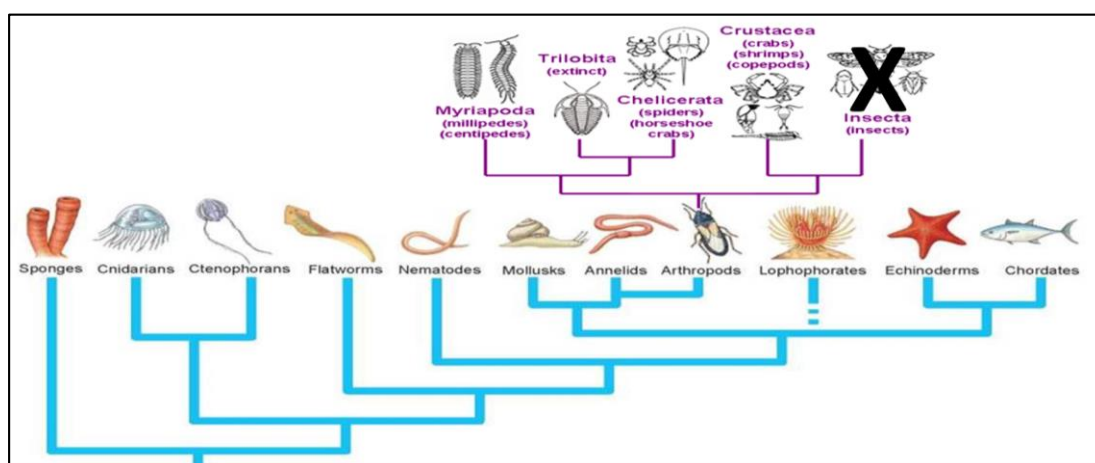


Figura 2. Enfoque analítico integral sobre microRNAs previamente reportados para Animalia con excepción de Insecta presentes en *Ae. aegypti* (huevos + macho + hembra).

Posteriormente, este ejercicio se repitió, pero ahora solo localizando los microRNAs previamente publicados para la Clase Insecta y no para el resto del Reino Animalia (Figura 3).

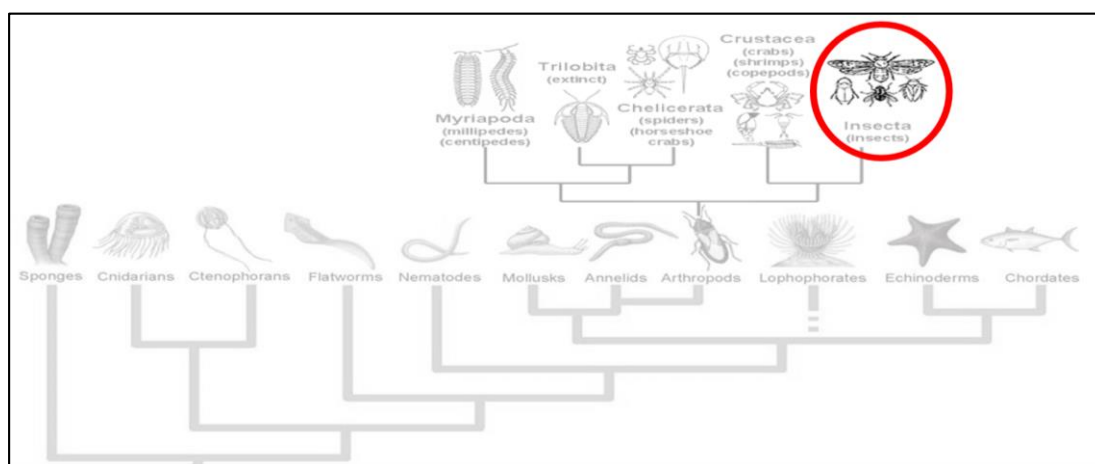


Figura 3. Enfoque analítico integral sobre microRNAs previamente reportados para Insecta presentes en *Ae. aegypti* (huevos + macho + hembra).

Una vez filtrados los resultados de secuenciación de nueva generación estos datos se utilizaron para realizar distintos enfoques experimentales. En el primer enfoque se compararon los microRNAs diferencialmente expresados entre hembras y machos (Figura 4).

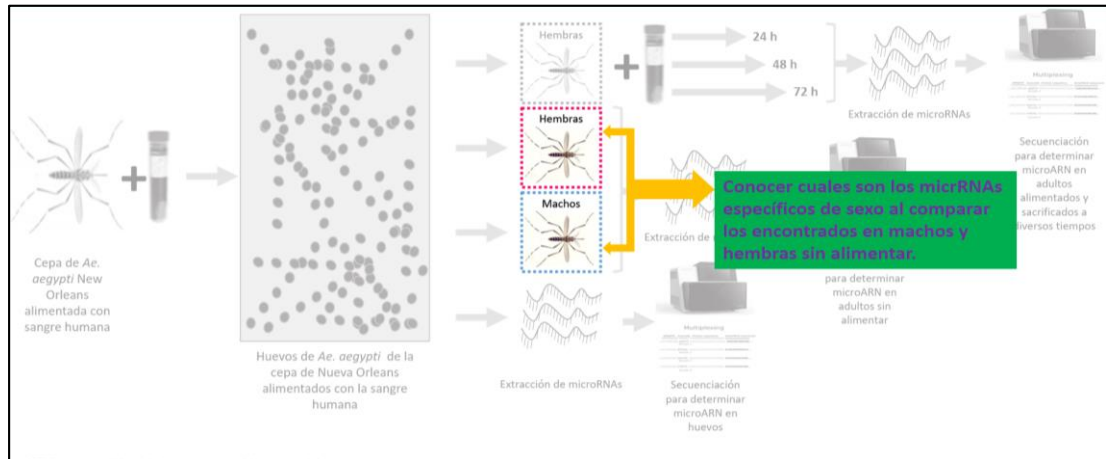


Figura 4. Contraste de la expresión diferencial de la expresión de los microRNAs entre machos y hembras.

Posteriormente se compararon los microRNAs diferencialmente expresados entre huevos y adultos (Figura 5).

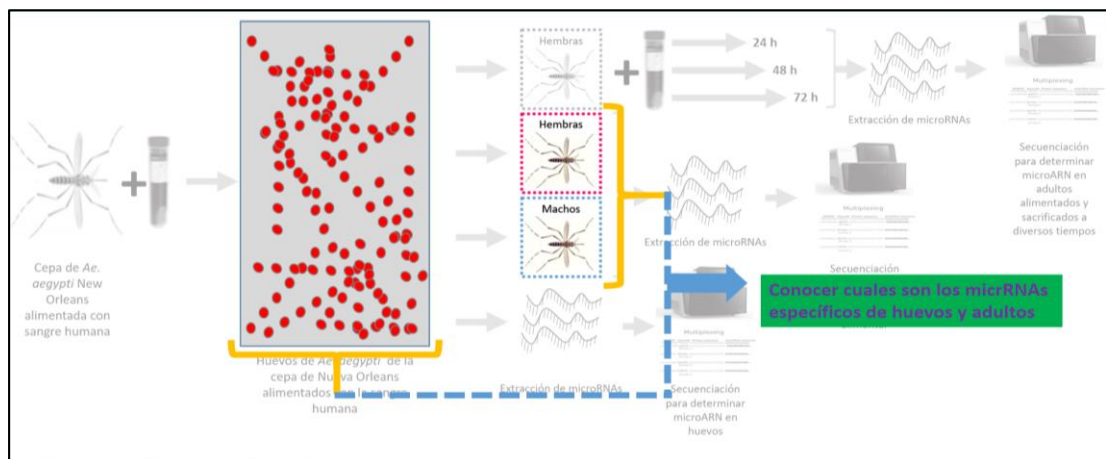


Figura 5. Comparación de la firma mirnómica entre huevos y adultos.

El último de los análisis fue determinar la huella mirnómica y cronológica relacionada con la ingesta y digestión de sangre humana (Figura 6).

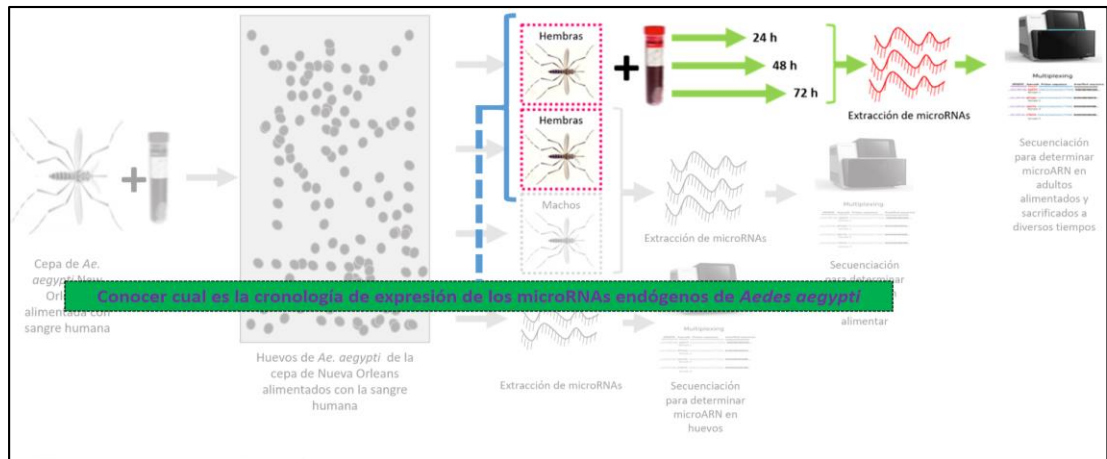


Figura 6. Análisis para la determinación del patrón cronológico de expresión correlacionado con la ingesta y digestión de sangre.

Determinado esto se utilizaron los resultados para conocer cuáles eran los microRNAs previamente publicados y encontrados en nuestros análisis, conocer microRNAs previamente publicados para *Ae. aegypti*, previamente publicados para Insecta, pero *De Novo* para *Ae. aegypti*, y cuáles eran los microRNAs reportados para Animalia, pero no en Insecta (Figura 7).

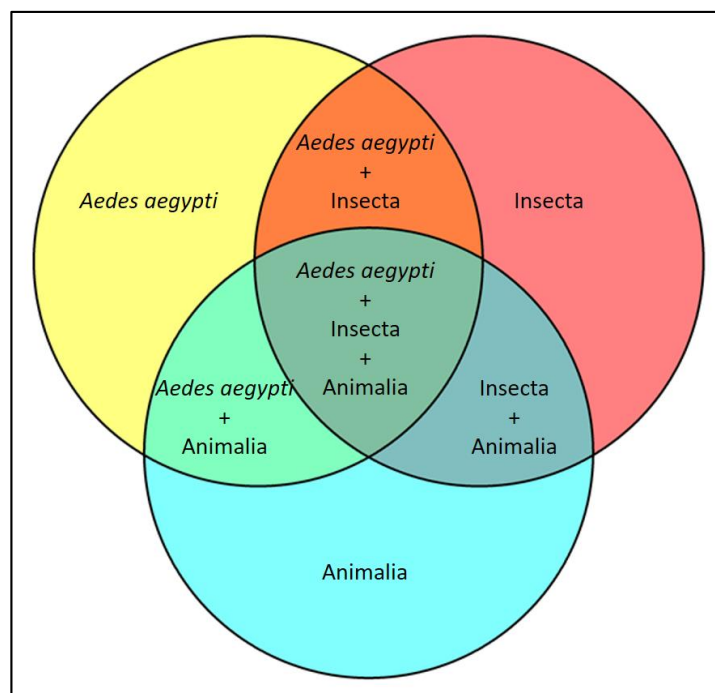


Figura 7. Categorización de microRNAs previamente reportados y encontrados en nuestros resultados.

Una vez categorizados los microRNAs se utilizaron para hacer los contrastes biológicos y determinar las diferencias de expresión.

7.2. Abundancia

7.2.1. Distribución por etapa de vida

7.2.1.1. Específicos de huevos en *Ae. aegypti*

En la determinación de microRNAs específicos de huevos se encontraron 13, de los cuales 6 microRNAs eran previamente reportados para *Ae. aegypti* y 7 reportados para otras especies (Figura 8).

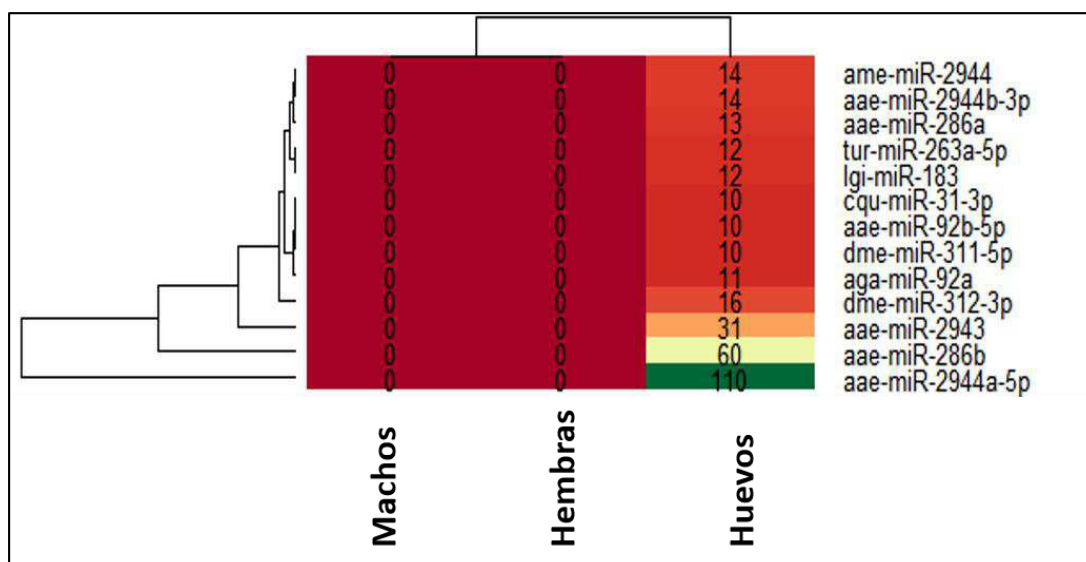


Figura 8. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de huevos en el contraste hecho contra hembras y machos.

Los 13 microRNAs encontrados con expresión específica en huevos tuvieron una distribución biológica en 7 especies distintas de diversas familias (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de huevos.

Organismo	Nombre
<i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-2944b-3p
	aae-miR-286a
	aae-miR-92b-5p
	aae-miR-2943
	aae-miR-286b
	aae-miR-2944a-5p
<i>Apis mellifera</i>	ame-miR-2944
<i>Tetranychus urticae</i>	tur-miR-263a-5p
<i>Lottia gigantea</i>	lgi-miR-183
<i>Culex pipiens</i>	cqu-miR-31-3p
<i>Drosophila melanogaster</i>	dme-miR-311-5p
	dme-miR-312-3p
<i>Anopheles gambiae</i>	aga-miR-92a

7.2.1.2. Específicos de adultos *Ae. aegypti*

En la determinación de los microRNAs con expresión exclusiva en adultos (tanto en hembras como machos) fueron localizados 45 presentes en nuestros resultados y ausentes en huevos (Figura 9).

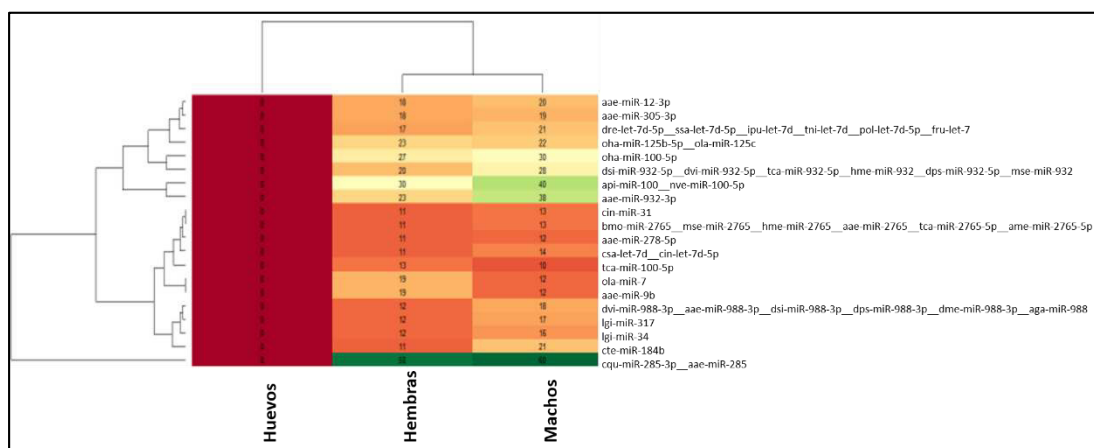


Figura 9. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados exclusivos de adultos (expresados entre hembras y machos).

De los 45 microRNAs 12 de ellos reportados solo para una especie y el resto con ortólogos en múltiples especies (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de microRNAs previamente reportados presentes en adultos (conservados entre hembras y huevos).

Organismo	Nombre
<i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-12-3p
	aae-miR-305-3p
	aae-miR-932-3p
	aae-miR-278-5p
	aae-miR-9b
	^⑦ aae-miR-988-3p
	^⑧ aae-mir-285
	^⑤ aae-mir-2765
<i>Tribolium castaneum</i>	^③ tca-miR-932-5p
	^⑤ tca-miR-2765-5p
	tca-miR-100-5p
<i>Ciona intestinalis</i>	cin-miR-31
	^⑥ cin-let-7d-5p
<i>Heliconius melpomene</i>	^③ hme-mir-932
	^⑤ hme-miR-2765
<i>Lottia gigantea</i>	lgi-miR-317
	lgi-miR-34
<i>Ophiophagus hannah</i>	^② oha-mir-125b-5p
	oha-mir-100-5p
<i>Oryzias latipes</i>	^② ola-mir-125c
	ola-miR-7
<i>Drosophila simulans</i>	^③ dsi-miR-932-5p
	^⑦ dsi-miR-988-3p
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	^③ dps-miR-932-5p
	^⑦ dps-miR-988-3p
<i>Drosophila virilis</i>	^③ dvi-miR-932-5p
	^⑦ dvi-miR-988-3p
<i>Bombyx mori</i>	^⑤ bmo-miR-2765
<i>Ciona savignyi</i>	^⑥ csa-let-7d
<i>Manduca sexta</i>	^⑤ mse-miR-2765
<i>Oryzias latipes</i>	ola-mir-7
<i>Capitella teleta</i>	cte-miR-184b
<i>Danio rerio</i>	^① dre-let-7d-5p
<i>Salmo salar</i>	^① ssa-let-7d-5p
<i>Drosophila melanogaster</i>	dme-miR-988-3p
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	^④ api-mir-100
<i>Nematostella vectensis</i>	^④ nve-miR-100-5p
<i>Anopheles gambiae</i>	^⑦ aga-mir-988
<i>Culex quinquefasciatus</i>	^⑧ cqu-miR-285-3p
<i>Ictalurus punctatus</i>	^① ipu-let-7d
<i>Apis mellifera</i>	^⑤ ame-miR-2765-5p
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	^① tni-let-7d
<i>Paralichthys olivaceus</i>	^① pol-let-7d-5p
<i>Mihaela Zavolan</i>	^① fru-let-7d
<i>Manduca sexta</i>	^③ mse-miR-932

NOTA: ^①, ^②, ^③, ^④, ^⑤, ^⑥, ^⑦ y ^⑧ son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.2. Distribución por sexo

7.2.2.1. Específicos de machos *Ae. aegypti*

Los microRNAs específicos expresados en machos fueron 10, de estos 2 microRNAs fueron previamente reportados para *Ae. aegypti* y 8 reportados para otras especies (Figura 10).

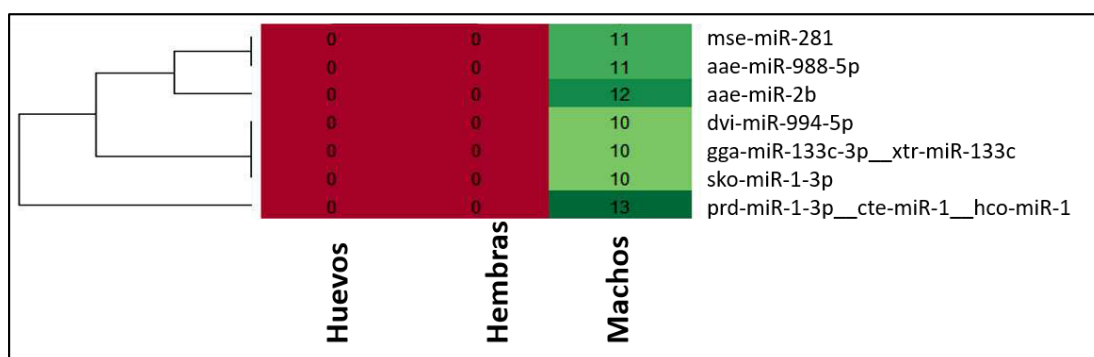


Figura 10. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de machos en el contraste hecho contra hembras y huevos.

De los anteriores microRNAs mencionados (Figura 10), 2 de ellos (Tabla 5) estaban reportados previamente para más de una especie con una homología del 100%.

Tabla 5. Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de machos.

Organismo	Nombre
<i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-988-5p
	aae-miR-2b
<i>Manduca sexta</i>	mse-miR-281
<i>Drosophila virilis</i>	dvi-miR-994-5p
<i>Gallus gallus</i>	① gga-miR-133c-3p
<i>Xenopus tropicalis</i>	① xtr-miR-133c
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	sko-miR-1-3p
<i>Panagrellus redivivus</i>	② prd-miR-1-3p
<i>Capitella teleta</i>	② cte-miR-1
<i>Haemonchus contortus</i>	② hco-miR-1

NOTA: ① y ② son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.2.2. Específicos de hembras *Ae. aegypti*

Los microRNAs específicos expresados en hembras fueron 7, de estos, 2 microRNAs fueron previamente reportados para *Ae. aegypti* y 5 reportados para otras especies (Figura 11).

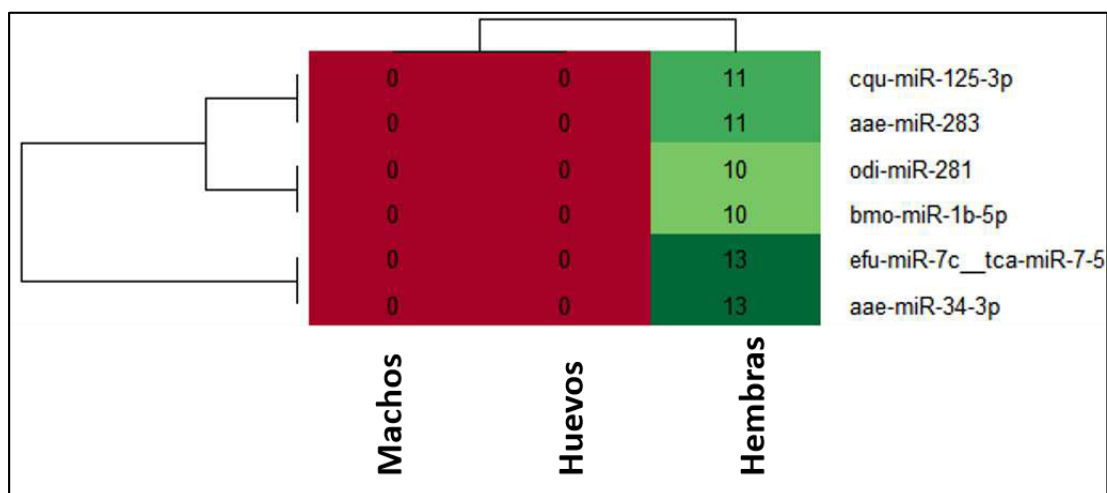


Figura 11. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y específicos de hembras en el contraste hecho contra machos y huevos.

Dos de los microRNAs fueron ortólogos con una homología del 100% (Tabla 6) entre 2 especies.

Tabla 6. Relación de microRNAs previamente reportados y exclusivos de hembras.

Organismo	Nombre
<i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-283
	aae-miR-34-3p
<i>Culex quinquefasciatus</i>	cqu-miR-125-3p
<i>Oikopleura dioica</i>	odi-miR-281
<i>Bombyx mori</i>	bmo-miR-1b-5p
<i>Eptesicus fuscus</i>	① efu-miR-7c
<i>Tribolium castaneum</i>	① tca-miR-7-5

NOTA: ① son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.2.3. Específicos de machos y huevos de *Ae. aegypti*

Los microRNAs específicos expresados en machos y huevos fueron 9, todos los microRNAs *De Novo* identificados para *Ae. aegypti* (Figura 12).

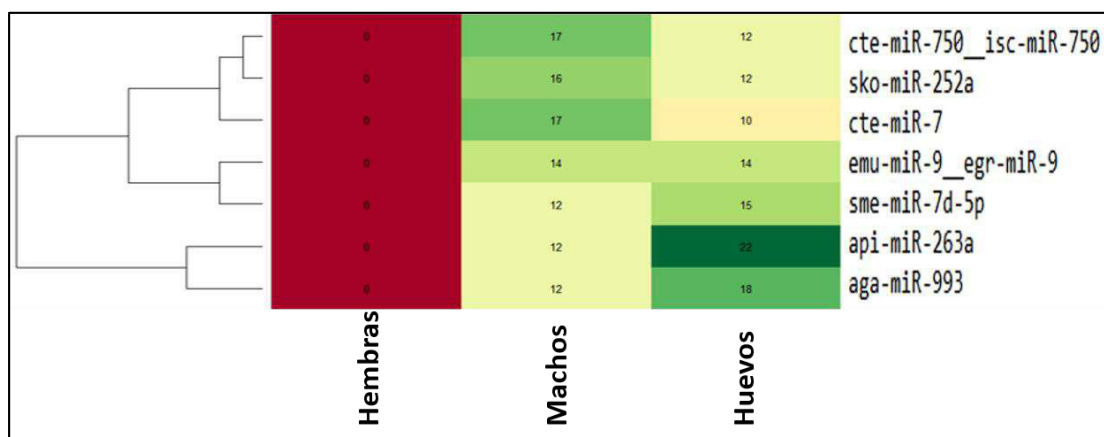


Figura 12. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y conservados entre machos y huevos en el contraste hecho contra hembras.

Dos de los microRNAs tenía ortología del 100% con más de una especie (Tabla 7).

Tabla 7. Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre machos y huevos.

Organismo	Nombre
<i>Capitella teleta</i>	cte-miR-7
	① cte-miR-750
<i>Ixodes scapularis</i>	① isc-miR-750
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	sko-miR-252a
<i>Echinococcus multilocularis</i>	② emu-miR-9
<i>Echinococcus granulosus</i>	② egr-miR-9
<i>Schmidtea mediterranea</i>	sme-miR-7d-5p
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	api-miR-263a
<i>Arabidopsis thaliana</i>	aga-miR-993

NOTA: ① y ② son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.2.4. Específicos de hembras y huevos

Los microRNAs específicos expresados en hembras y huevos fueron 12, de los cuales 4 microRNAs estaban previamente reportados para *Ae. aegypti* (Figura 13), 2 de estos eran ortólogos para *Culex quinquefasciatus*.

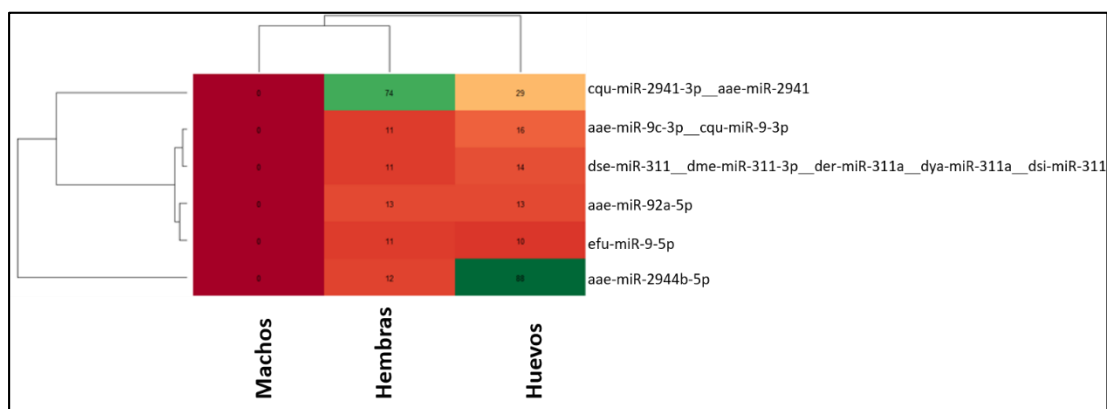


Figura 13. Mapa de calor que enlista los microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos en el contraste hecho contra machos.

Uno de los microRNAs presento ortología entre 5 especies distintas, todas ellas *Drosophila* (Tabla 8).

Tabla 8. Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos.

Organismo	Nombre
<i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-2944b-5p
	aae-miR-92a-5p
	① aae-miR-2941
	② aae-miR-9c-3p
<i>Culex quinquefasciatus</i>	① cqu-miR-2941-3p
	② cqu-miR-9-3p
<i>Eptesicus fuscus</i>	efu-miR-9-5p
<i>Drosophila sechellia</i>	③ dse-miR-311
<i>Drosophila melanogaster</i>	③ dme-miR-311-3p
<i>Drosophila erecta</i>	③ der-miR-311a
<i>Drosophila phylogeny</i>	③ dya-miR-311a
<i>Drosophila simulans</i>	③ dsi-miR-311

NOTA: ①, ② y ③ son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.3. Distribución cronológica de alimentación

Fueron 11 los microRNAs con expresión exclusiva a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea, 1 microRNAs pertenecientes a 32 distintas especies (Figura 14).

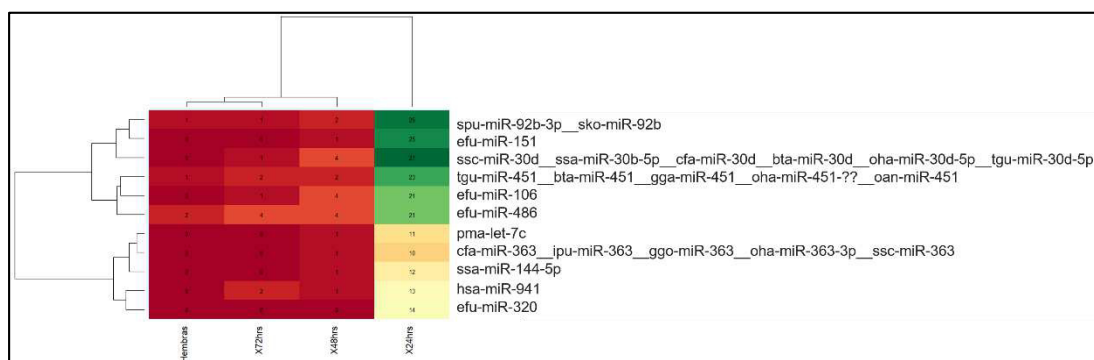


Figura 14. Mapa de calor con los microRNAs previamente reportados en el reino Animalia con expresión exclusivos a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.

De los 11 distintos microRNAs, dos de ellos habían sido previamente reportados en 5 distintas especies cada uno, otro de ellos en 6 especies y otro más en 2 especies, los 7 restantes son específicos de especie (Tabla 9), ninguno previamente reportado para *Ae. aegypti*.

Tabla 9. Relación de microRNAs previamente reportados presentes a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.

Organismo	Nombre
<i>Eptesicus fuscus</i>	efu-miR-151
	efu-miR-106
	efu-miR-486
	efu-miR-320
<i>Ophiophagus hannah</i>	④ oha-miR-363-3p
	③ oha-miR-451
<i>Bos taurus</i>	② oha-miR-30d-5p
	③ bta-miR-451
<i>Sus scrofa</i>	② bta-miR-30d
	② ssc-miR-30d
<i>Taeniopygia guttata</i>	④ ssc-miR-363
	③ tgu-miR-451
<i>Canis familiaris</i>	② tgu-miR-30d-5p
	② cfa-miR-30d
<i>Salmo salar</i>	④ cfa-miR-363
	② ssa-miR-30b-5p
<i>Ictalurus punctatus</i>	④ ipu-miR-363
	④ ggo-miR-363
<i>Gorilla gorilla</i>	③ gga-miR-451
	③ oan-miR-451
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	① sko-miR-92b
	① spu-miR-92b-3p
<i>Strongylocentrotus purpur</i>	hsa-miR-941
<i>Homo sapiens</i>	ssa-miR-144-5p
<i>Salmo salar</i>	pma-let-7c
<i>Petromyzon marinus</i>	

NOTA: ①, ②, ③ y ④ son microRNAs ortólogos con 100% de homología.

7.2.4. microRNAs humanos presentes en *Ae. aegypti*

En la búsqueda de microRNAs previamente reportados para el humano presente en bases de datos de huevos, hembras y machos se encontraron 10 microRNAs (Figura 15).

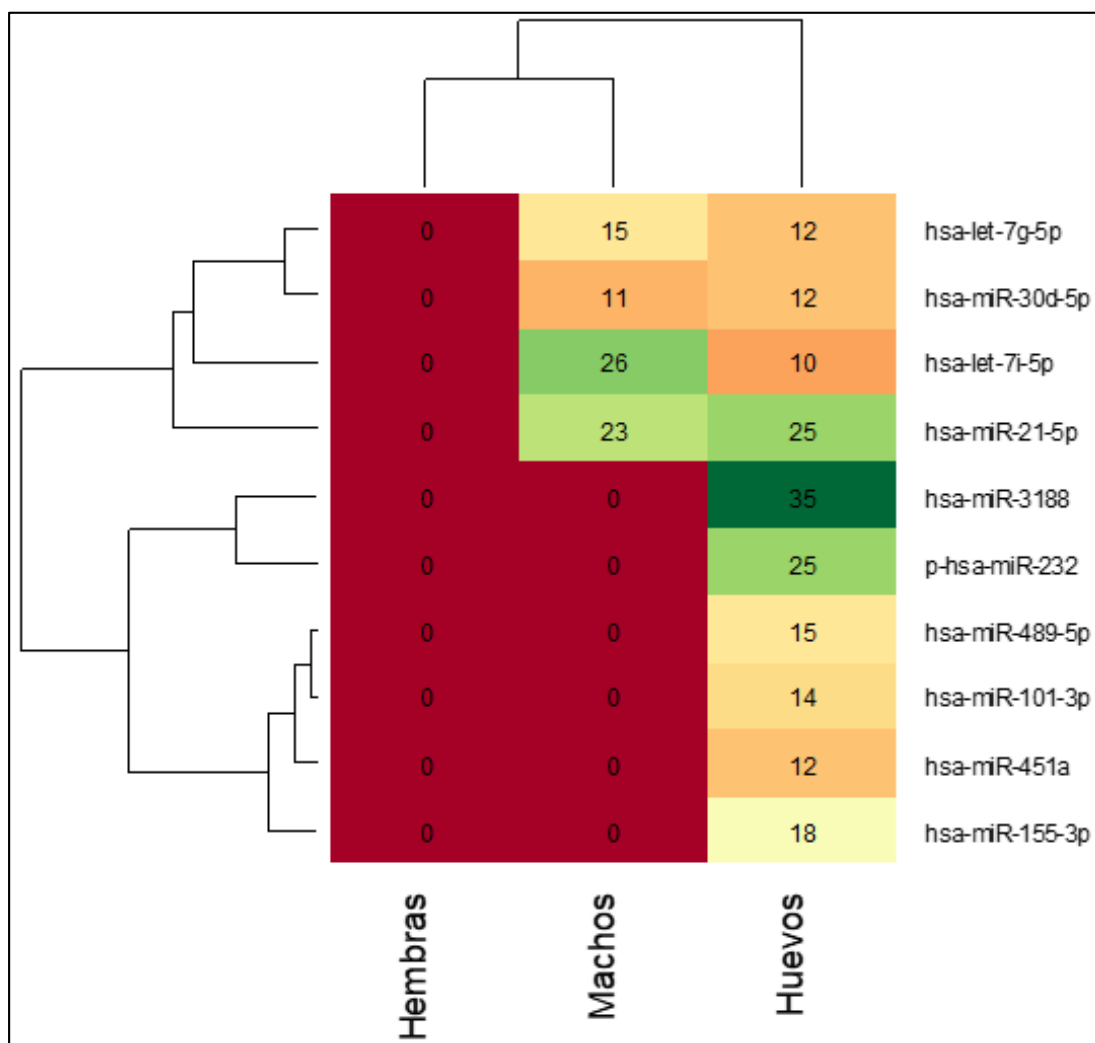


Figura 15. Mapa de calor con los microRNAs previamente reportados en el reino Animalia con expresión exclusivos a las 24 horas posteriores a la alimentación sanguínea.

De los 10 microRNAs previamente reportados para el humano y encontrados con expresión en las bases de datos de *Ae. aegypti* (Tabla 10).

Tabla 10. Relación de microRNAs previamente reportados y conservados entre hembras y huevos.

Organismo	Nombre
Homo sapiens	hsa-let-7g-5p
	hsa-miR-30d-5p
	hsa-let-7i-5p
	hsa-miR-21-5p
	hsa-miR-3188
	hsa-miR-232
	hsa-miR-489-5p
	hsa-miR-101-3p
	hsa-miR-451a
	hsa-miR-155-3p

Del total de los microRNAs humanos encontrados presentes en nuestras bases, 6 de ellos (hsa-miR-let-7g-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21, hsa-miR-101 y hsa-miR-451), tienen ortología en diversos y variados números de especies (Tabla 10) y 4 (hsa-miR-3188, hsa-miR-232, hsa-miR-489-5p, y hsa-miR-155-3p) más reportados a la fecha solo para el humano (Tabla 10).

Tabla 11. Relación de microRNAs dada por ortología y homología.

Especie con paralogia y 100% de homologia	microRNA de <i>Homo sapiens</i>					
	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-451a
<i>Anolis carolinensis</i>	aca-let-7g aca-let-7i-5p	aca-miR-30d-5p		aca-miR-21-5p		aca-miR-451-5p
<i>Ateles geoffroy</i>				age-miR-21		
<i>Bos taurus</i>	bta-let-7g		bta-let-7i		bta-miR-101	
<i>Canis familiaris</i>	cfa-let-7g					cfa-miR-451
<i>Cricetulus griseus</i>	cgr-let-7g-5p			cgr-miR-21-5p		
<i>Capra hircus</i>	chi-let-7g-5p		chi-let-7i-5p			
<i>Danio rerio</i>		dre-miR-30d	dre-let-7i			dre-miR-451
<i>Equus caballus</i>	eca-let-7g	eca-miR-30d		eca-miR-21	eca-miR-101	
<i>Fugu rubripes</i>		fru-miR-30d	fru-let-7i			
<i>Gallus gallus</i>		gga-miR-30d		gga-miR-21-5p		
<i>Gorilla gorilla</i>		ggo-miR-30d		ggo-miR-21		
<i>Ictalurus punctatus</i>			ipu-let-7i			
<i>Monodelphis domestica</i>				mdo-miR-21-5p		
<i>Macaca mulatta</i>	mml-let-7g-5p mmu-let-7g-5p	mml-miR-30d-5p mmu-miR-30d-5p	mml-let-7i-5p mmu-let-7i-5p	mml-miR-21-5p mmu-miR-2	mmu-miR-101a-3	mml-miR-451 mmu-miR-451a
<i>Macaca nemestrina</i>		mne-miR-30d		mne-miR-21		
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>			oan-let-7g-5p	oan-miR-21-5p		
<i>Ovis aries</i>			oar-let-7i			
<i>Ophiophagus hannah</i>	oha-let-7g-5p		oha-let-7i-5p			
<i>Pan paniscus</i>		ppa-miR-30d		ppa-miR-21		
<i>Pongo pygmaeus</i>	ppy-let-7g	ppy-miR-30d	ppy-let-7i	ppy-miR-21	ppy-miR-101 ppy-miR-451	
<i>Pan troglodytes</i>	ptr-let-7g	ptr-miR-30d	ptr-let-7i	ptr-miR-21		ptr-miR-451
<i>Rattus norvegicus</i>	rno-let-7g-5p	rno-miR-30d-5p	rno-let-7i-5p	rno-miR-21-5p	rno-miR-101a-3p	rno-miR-451-5p
<i>Salmo salar</i>			ssa-let-7i-5p			
<i>Sus scrofa</i>	ssc-let-7g			ssc-miR-21		ssc-miR-101 ssc-miR-451
<i>Tupaia chinensis</i>	tch-let-7g-5p		tch-let-7i-5p	tch-miR-21-5p		
<i>Taeniopygia guttata</i>	tgu-let-7g-5p		tgu-let-7i-5p	tgu-miR-21-5p		
<i>Tetraodon nigroviridis</i>		tni-miR-30d	tni-let-7i			
<i>Xenopus tropicalis</i>		xtr-miR-30d				xtr-miR-451

7.3. Riqueza biológica

La riqueza de nuestros hallazgos fue plasmada en diagramas de Venn para poder ser visualizada e interpretada.

7.3.1. *Ae. aegypti*

Un total de 78 microRNAs previamente reportados para *Ae. aegypti* fueron encontradas diferencialmente expresados en nuestros resultados (Figura 16).

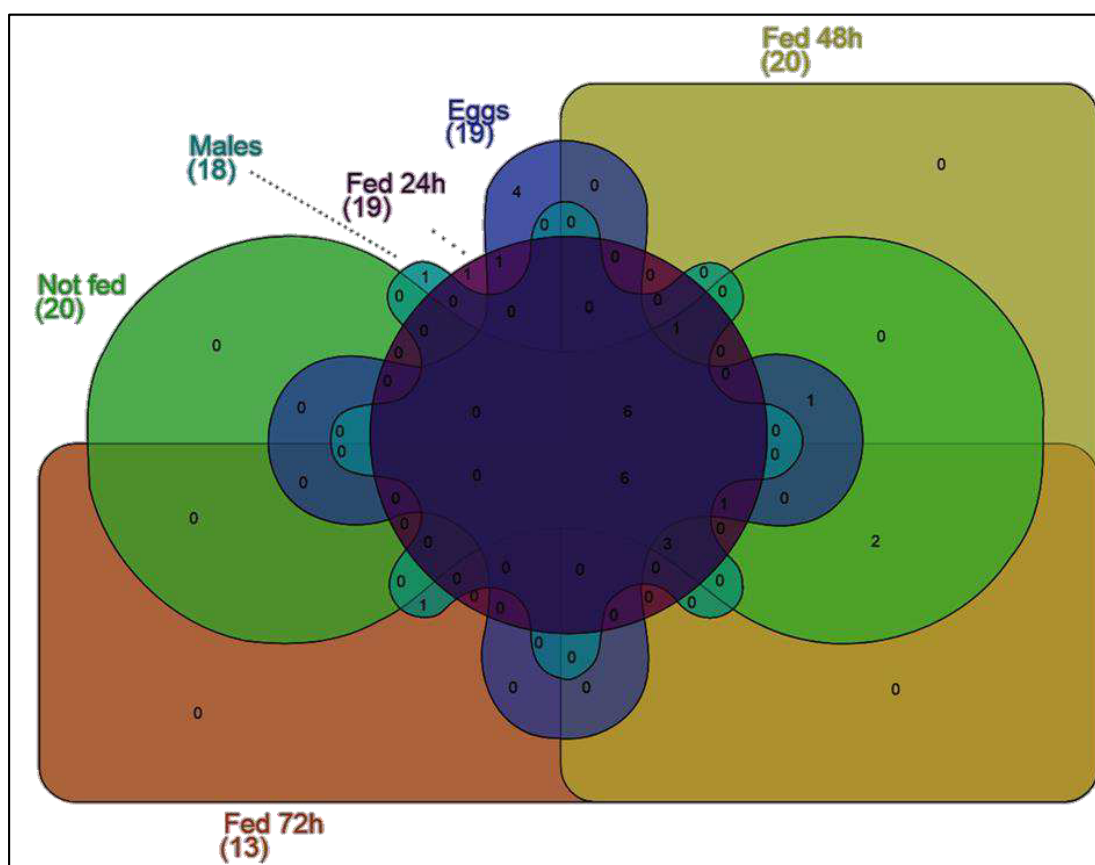


Figura 16. Diagrama de Venn de microRNAs encontrados en nuestros resultados previamente reportados para *Ae. aegypti*.

De los microRNAs previamente reportados para *Ae. aegypti*, solo 1 de ellos fue encontrado de manera específica en hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 horas, 4 específicos de huevos, 1 específico de machos. El resto de ellos se comparten entre enfoques experimentales abordados.

7.3.2. Insecta

Un total de 82 microRNAs previamente reportados en distintas especies de la clase Insecta fueron encontrados diferencialmente expresados en nuestros resultados (Figura 17).

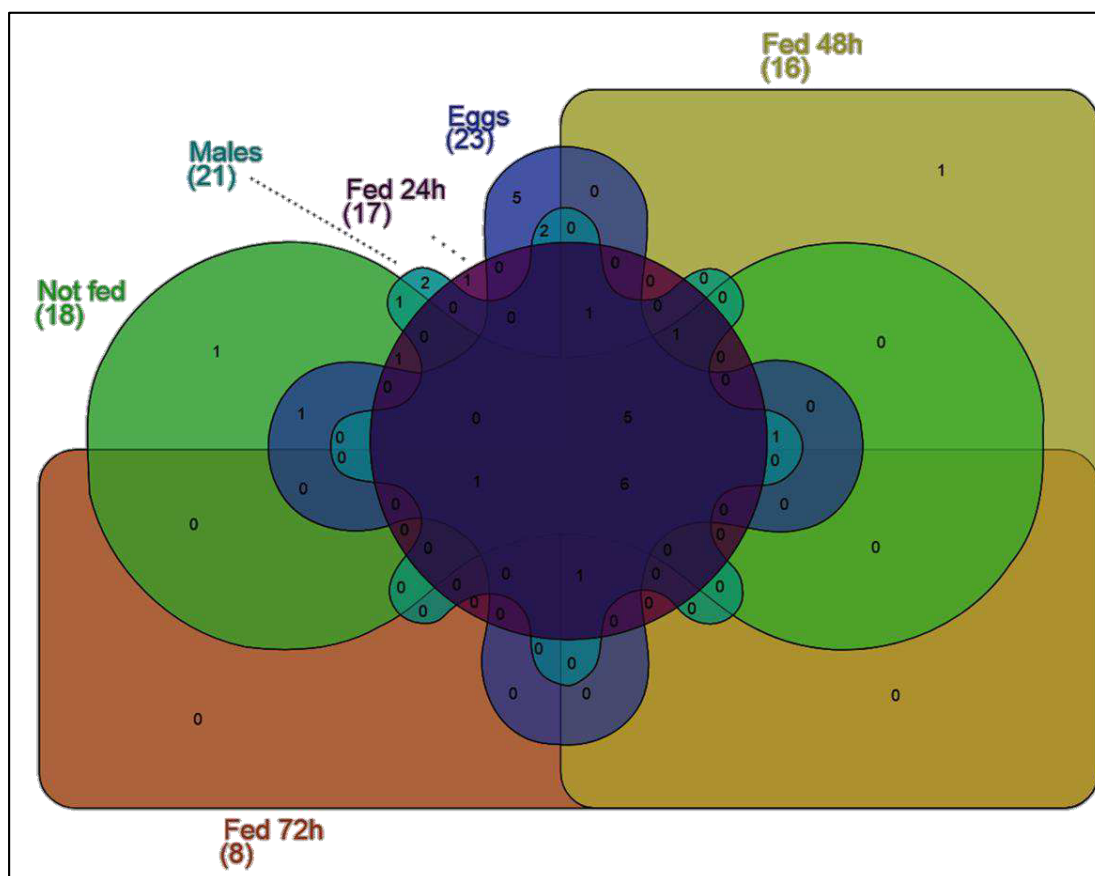


Figura 17. Diagrama de Venn de microRNAs reportados previamente en Insecta (no *Ae. aegypti* y encontrados en nuestros resultados.

Estos 82 microRNAs correspondían a 18 de hembra no alimentadas, 17 a hembras y sacrificadas a las 24 horas, 16 a hembras y sacrificadas a las 48 horas y 8 a hembras y sacrificadas a las 72 horas, 21 microRNAs más a machos y 23 a huevos. De los microRNAs previamente reportados para clase Insecta, solo 1 de ellos fue encontrado de manera específica en hembras sin alimentar, 2 en machos, 5 en huevos, 1 en hembras alimentadas sacrificadas a las 24 horas, y 1 en hembras y sacrificadas a las 48 horas. En la intersección de todos los enfoques experimentales se encontraron 6 microRNAs expresados de manera simultánea.

7.3.3. Animalia

Los microRNAs previamente reportados para el orden Animalia (no Insecta) encontrados en nuestros resultados fueron 119 (Figura 18).

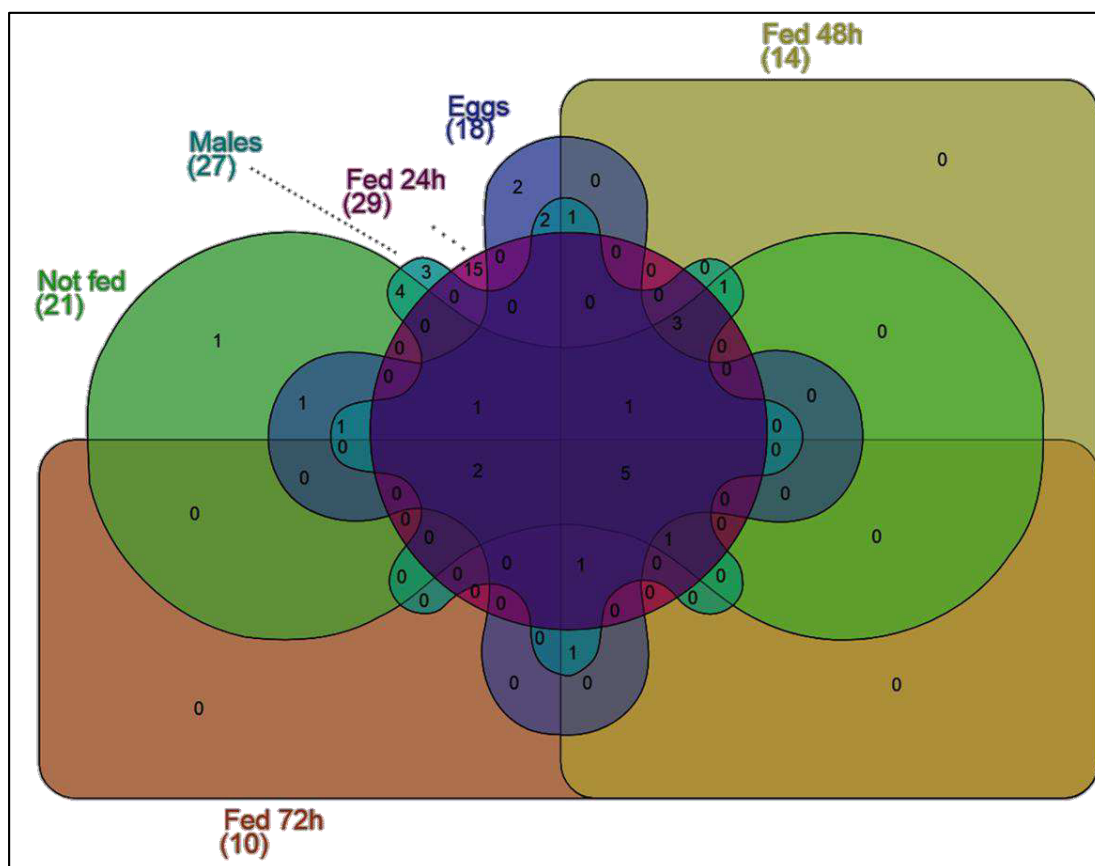


Figura 18. Diagrama de Venn de microRNAs encontrados en nuestros resultados previamente reportados para Animalia.

De los 119 microRNAs reportados previamente para Animalia (no Insecta), 1 específicamente expresado en hembras no alimentadas, 15 específicamente expresado en hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 horas, 3 en machos y 2 en huevos.

7.3.4. *Ae. aegypti* + Insecta

También se minaron nuestros resultados en búsqueda de microRNAs previamente reportados para *Ae. aegypti* y simultáneamente en otros insectos de la misma clase, la búsqueda arrojó 121 moléculas (Figura 19).

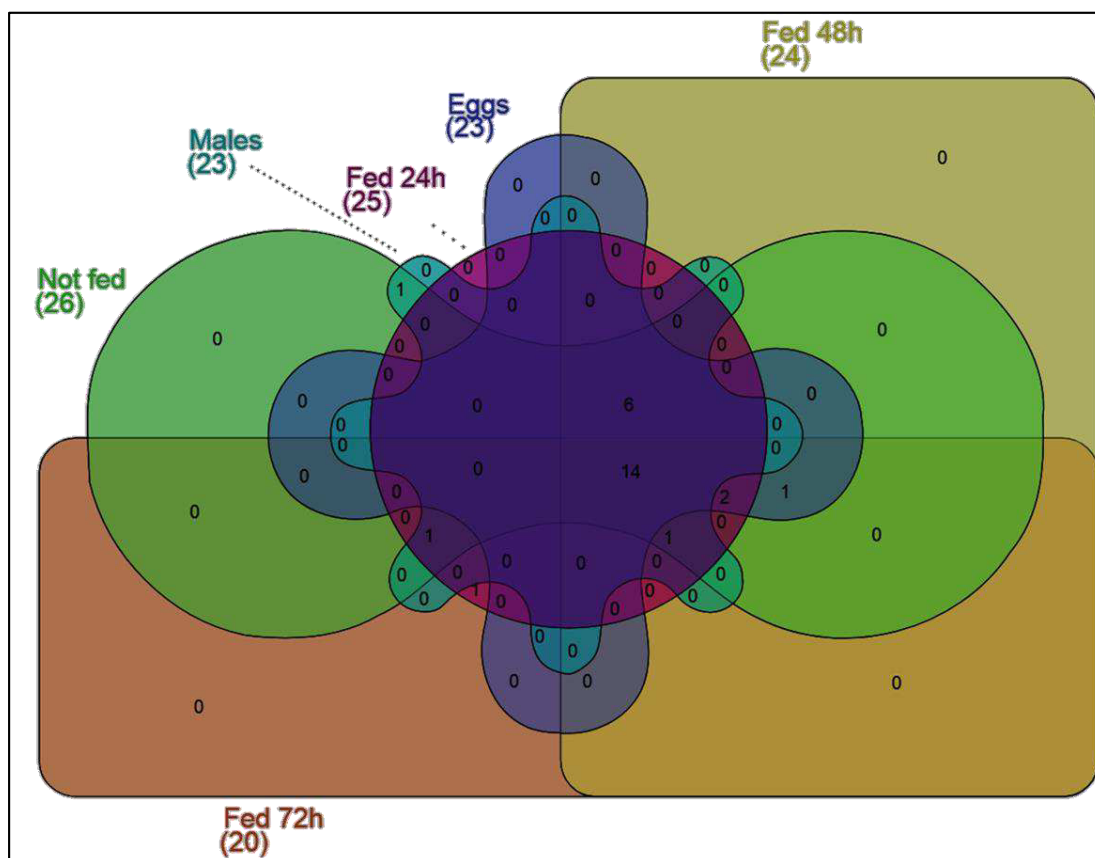


Figura 19. Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en *Ae. aegypti* e Insecta y encontrados en nuestros resultados.

De los 121 microRNAs, 14 de ellos se encontraron coexpresados en todos los enfoques experimentales analizados.

7.3.5. Insecta + Animalia

De los microRNAs reportados previamente reportados para Insecta y Animalia (no reportados en *Ae. aegypti*) fueron 13(Figura 20).

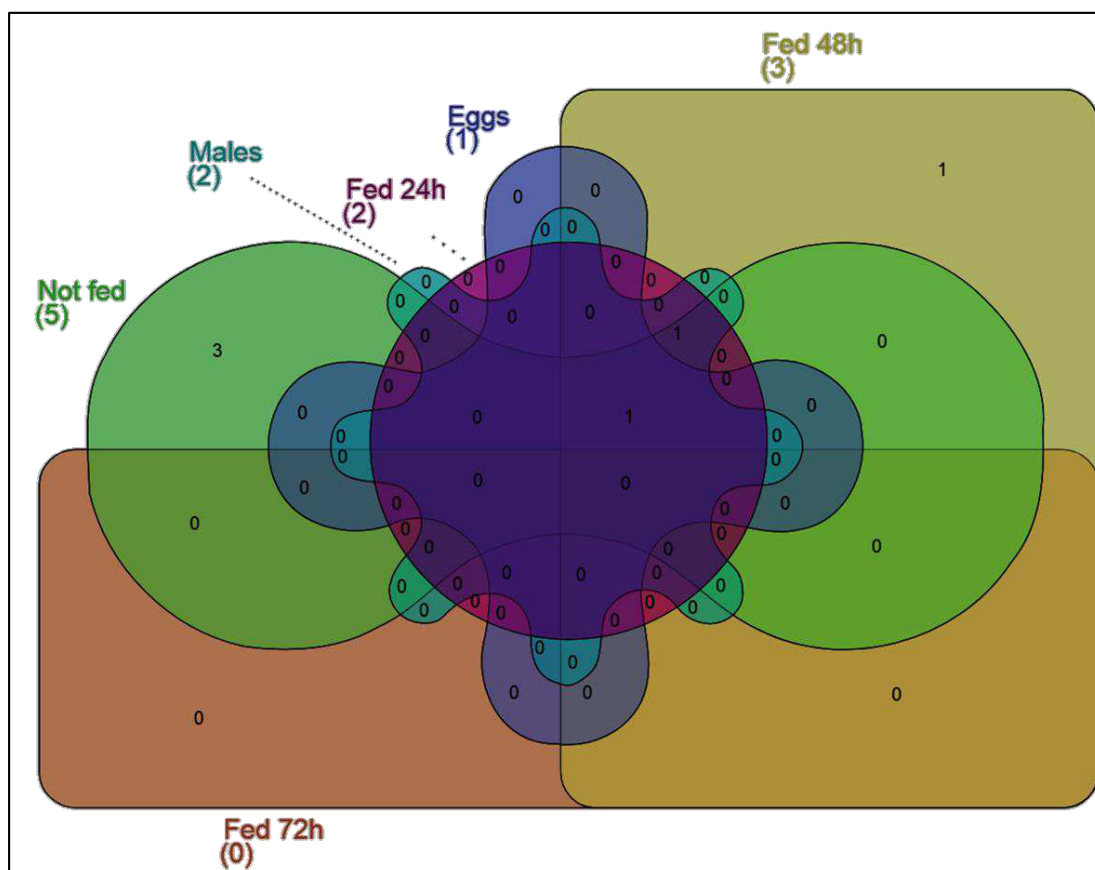


Figura 20. Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en Insecta y Animalia encontrados en nuestros resultados.

De los 13 microRNAs previamente reportados para Insecta y Animalia, 1 fue específico de huevos, 2 de machos, 5 de hembras no alimentadas y 2 microRNAs en hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 hora, y 1 microRNA más específico de hembras alimentadas y sacrificadas a las 48 horas.

7.3.6. *Ae. aegypti* + Insecta + Animalia

Otro de los enfoques explorados fue buscar en nuestros resultados microRNAs previamente reportados y conservados en *Ae. aegypti*, Insecta y Animalia, y fueron un total de 14 (Figura 21).

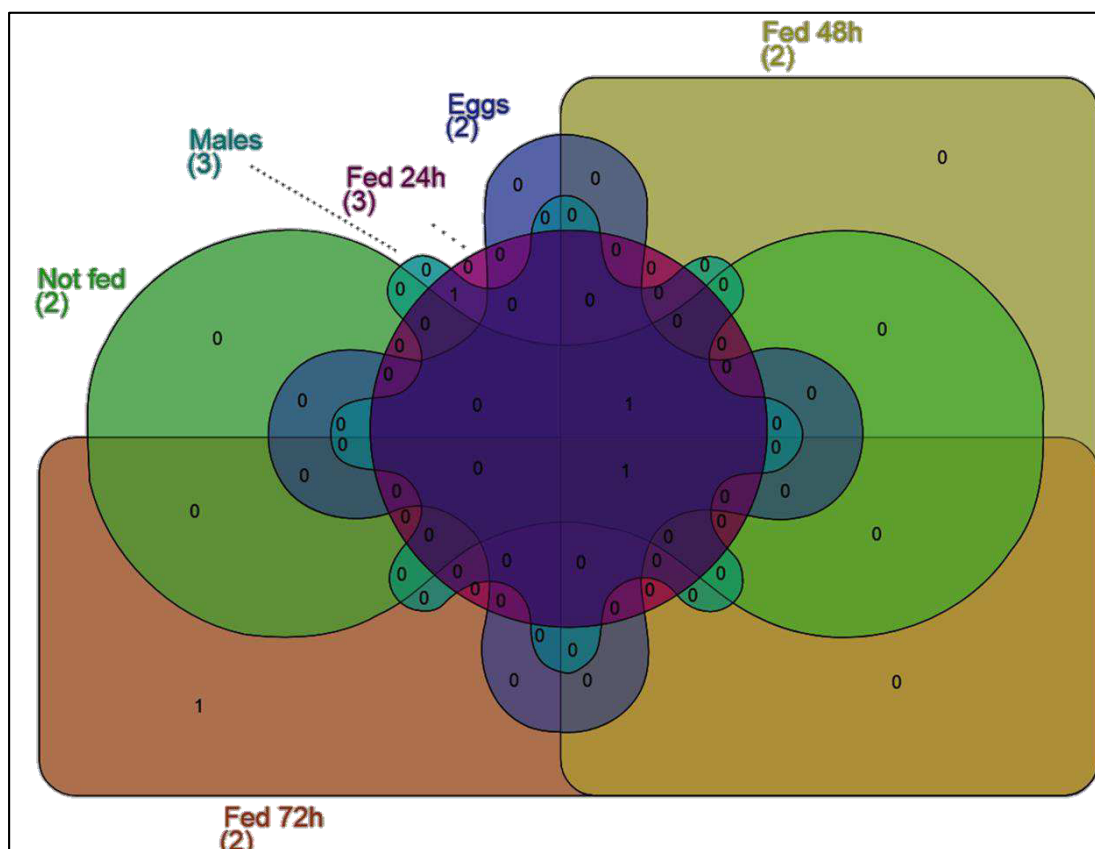


Figura 21. Diagrama de Venn de microRNAs previamente reportados en Insecta y Animalia y también en *Ae. aegypti* encontrados en nuestros resultados.

De los 14 microRNA encontrados expresados en los enfoques experimentales explorados, 1 fue encontrado con expresión exclusiva en hembras alimentadas y sacrificadas a las 72 horas posteriores la alimentación, también se encontró 1 microRNA con expresión simultánea en todos los enfoques analizados.

7.4. Interacciones

Las coexpresiones de los microRNAs previamente publicados para Insecta y *De Novo* para *Ae. aegypti* se plasmaron en diagramas de interacción para poder visualizar fácilmente las intersecciones entre ellos. Dos distintos interactomas fueron realizados donde se visualizaron las interacciones dadas según la cronología relacionada con la alimentación, el otro interactoma correlaciona 2 distintos enfoques: 1.- coexpresión y expresión exclusiva relacionada al sexo (Figura 22) y 2.- microRNAs exclusivos tanto de adultos como de embriones (Figura 23).

7.4.1. microRNAs cronológicamente expresados

Se determinaron las interacciones posibles de los microRNAs expresados a distintas etapas postalimentación, se categorizaron microRNAs específicos de cada una de las etapas postprandiales (Figura 22): 11 microRNAs con expresión específica en hembras sin alimentar, 16 microRNAs con expresión específica en hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 horas postprandiales, 2 microRNAs con expresión específica en hembras alimentadas y sacrificadas a las 48 horas postprandiales y 1 microRNAs con expresión específica en hembras alimentadas y sacrificadas a las 72 horas postprandiales.

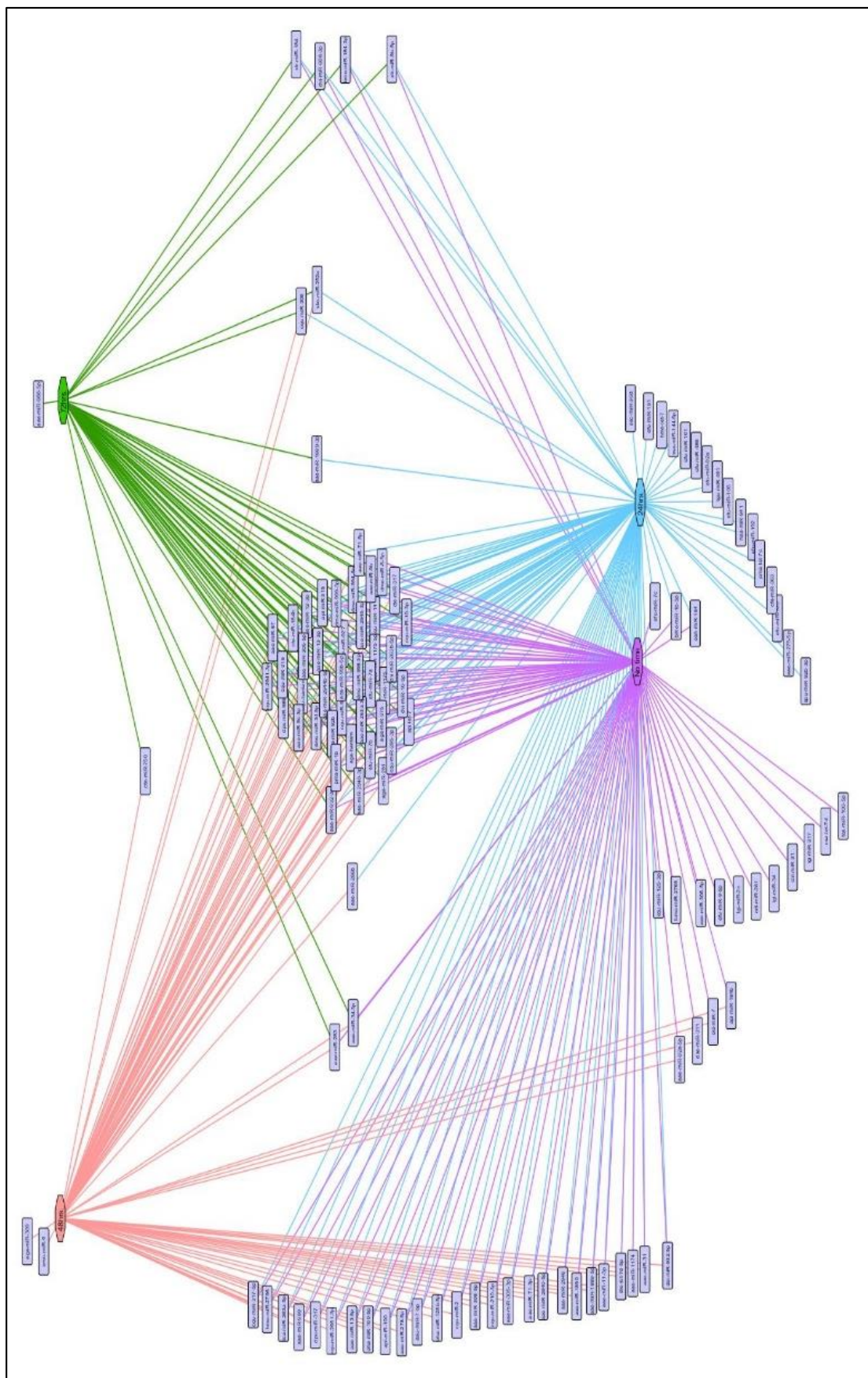


Figura 22. Interactoma de coexpresión dada cronológicamente relativa a la alimentación.

En las interacciones también se dedujeron 3 microRNAs interactuando de manera específica entre hembras no alimentadas y alimentadas y sacrificadas a las 24 horas, 1 microRNA interactuando entre hembras alimentadas y sacrificadas a las 24 y 48 horas, 1 microRNA interactuando entre hembras alimentadas y sacrificadas a las 48 y 72 horas y 1 microRNA interactuando entre hembras alimentadas y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas.

7.4.2. microRNAs por sexo y estadio de vida

De los 120 microRNAs previamente reportados en *Insecta*, pero *De Novo* para *Ae. aegypti* encontrados con expresión en los enfoques realizados de hembras, machos y huevos se dedujo que 13 eran específicos de huevos, 5 de hembras y 7 de machos (Figura 23).

Entre las coexpresiones encontramos que existen 22 microRNAs de expresión exclusiva en adultos, 6 microRNAs de expresión compartida entre huevos y hembras y 8 microRNAs de expresión compartida entre huevos y machos. Los 49 restantes coexpresaban en los 3 enfoques experimentales.

7.5. Paralogia y coexpresión

El diagrama de Upset permite visualizar la paralogia de los microRNAs predichos *De Novo* para *Ae. aegypti* previamente reportados para la clase Insecta (Figura 24).

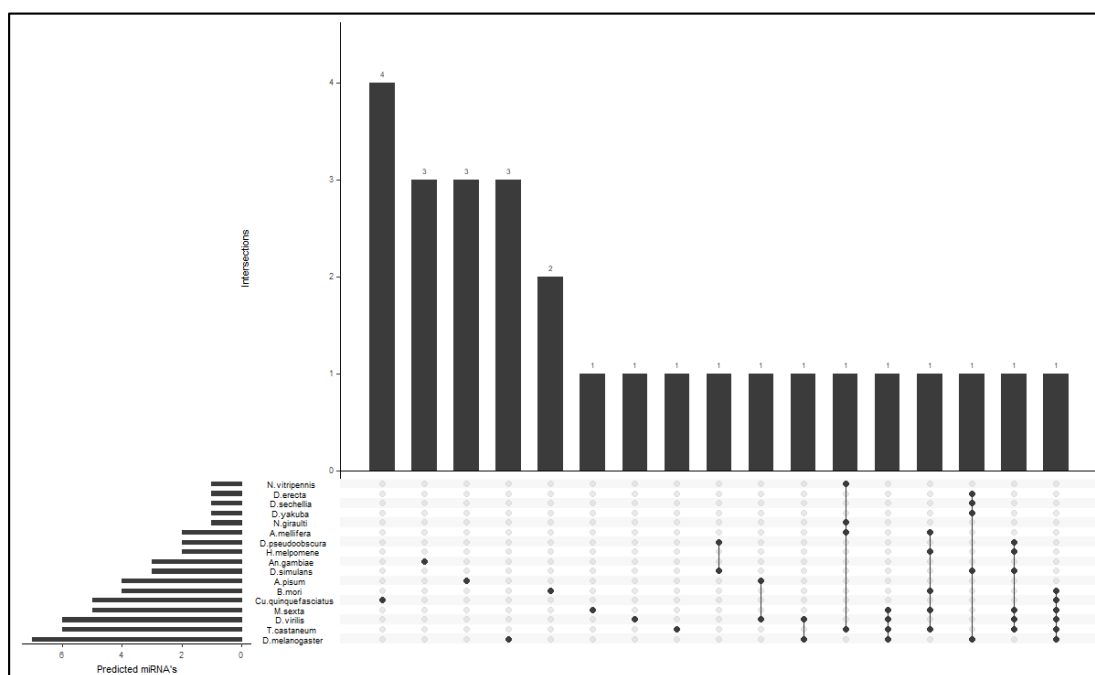


Figura 24. Diagrama UpSet que demuestra la interacción de los microRNAs *De Novo* para *Ae. aegypti* previamente reportado en otros organismos de la clase Insecta.

De los 5 microRNAs previamente reportados para organismos de la clase Insecta *De Novo* descritos en *Ae. aegypti*, 18 microRNAs en una especie única y 36 en múltiples especies, de las cuales 3 microRNAs se encontraron en al menos 2 especies, 2 microRNAs en 4 especies, 2 microRNAs en 5 especies y 2 microRNAs en 6 especies.

Tabla 12. Relación de microRNAs previamente reportados para la clase Insecta y *De Novo* para *Ae. aegypti*.

Lecturas obtenidas entre muestras			Especies de la clase Insecta																		Número de especies donde se a reportado el microRNA
Machos	Hembras	Huevos	<i>An.gambiae</i>	<i>A.melifera</i>	<i>A.pisum</i>	<i>B.mori</i>	<i>Ca.quinquifasciatus</i>	<i>N.vitripennis</i>	<i>M.sexta</i>	<i>D.ereecta</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>D.pseudobscura</i>	<i>D.sechellii</i>	<i>D.simulans</i>	<i>D.virilis</i>	<i>T.castaneum</i>	<i>H.melpomene</i>	<i>D.yakuba</i>	<i>N.graulii</i>		
17	20	13	ago-bortum																	①	
48	48	29	ago-miR-281																		
12	0	12	ago-miR-993																		
40	30	0			api-miR-100																
16	13	5			api-miR-184b																
12	0	15			api-miR-263a																
17	14	0				bmo-miR-184-3p															
0	10	0				bmo-miR-1b-5p															
10	13	0															aca-miR-100-5p				
55	45	12					cpu-miR-210-3p														
0	11	0					cpu-miR-125-3p														
54	42	61					cpu-miR-2951-3p														
27	38	18					cpu-miR-317-5p														
11	0	0							me-miR-281												
10	0	0														dis-miR-994-5p					
0	0	5									dre-miR-312-3p										
69	54	20									dre-miR-34-5p										
15	18	18									dre-miR-994-5p										
41	24	23			api-miR-315											dis-miR-315a					
27	22	25										spo-miR-989		dis-miR-989							
22	31	29									dre-miR-998-3p				dis-miR-998-3p						
31	35	0		dre-miR-317				dre-miR-317								aca-miR-317-3p			api-miR-317		
81	66	49							me-miR-263a		dre-miR-263a-5p				dis-miR-263a-5p	aca-miR-263a-5p					
110	95	57		dre-miR-2796		bmo-miR-2796-3p			me-miR-2796							aca-miR-2796-3p	dre-miR-2796				
0	11	0								der-miR-311a	dre-miR-311-3p		dis-miR-311	dis-miR-311				dis-miR-311a			
28	20	0							me-miR-932			spo-miR-932-5p		dis-miR-932-5p	dis-miR-932-5p	aca-miR-932-5p	dre-miR-932				
122	96	111				bmo-miR-10-3p	cpu-miR-10-3p		me-miR-10a		dre-miR-10-3p				dis-miR-10-3p	aca-miR-10-3p					

NOTA: Los números hasta la parte superior o derecha según sea el punto de vista refieren el número de especies donde el mismo microRNA ha sido previamente reportado.

En la distribución se detectaron 18 microRNAs (aga-bantam, aga-miR-281, aga-miR-993, dvi-miR-994-5p, tca-miR-100-5p, api-miR-100, api-miR-184b, api-miR-263a, bmo-miR-184-3p, bmo-miR-1b-5p, cqu-miR-210-3p, cqu-miR-125-3p, cqu-miR-2951-3p, cqu-miR-317-5p, mse-miR-281, dme-miR-312-3p, dme-miR-34-5p y dme-miR-994-5p) previamente reportados en 7 distintas especies (*An. gambiae*, *A. mellifera*, *A. pisum*, *B. mori*, *Cx. quinquefasciatus*, *N. vitripennis*, *M. sexta*, *D. erecta*, *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. sechellia*, *D. simulans*, *D. virilis*, *T. castaneum*) sin ortología reportada a la fecha (Tabla 12), 6 microRNAs (dps-miR-989, dsi-miR-989, api-miR-315, dvi-miR-315a, dme-miR-998-3p y dvi-miR-998-3p) reportados en 5 especies de la clase Insecta (*A. pisum*, *B. mori*, *Cx. quinquefasciatus*, *N. vitripennis*, *M. sexta*, *D. erecta*, *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. sechellia*, *D. simulans* y *D. virilis*), 8 microRNAs (mse-miR-263a, dme-miR-263a-5p, dvi-miR-263a-5p, tca-miR-263a-5p, ame-miR-317, nvi-miR-317, tca-miR-317-3p, ngi-miR-317) de 16 especies (*A. mellifera*, *A. pisum*, *B. mori*, *Cx. quinquefasciatus*, *N. vitripennis*, *M. sexta*, *D. erecta*, *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. sechellia*, *D. simulans*, *D. virilis*, *T. castaneum*, *H. melpomene*, *D. yakuba* y *N. giraulti*), 10 microRNAs (ame-miR-2796, bmo-miR-2796-3p, mse-miR-2796, tca-miR-2796-3p, hme-miR-2796, der-miR-311, dme-miR-311-3p, dse-miR-311, dsi-miR-311 y dya-miR-311a) de 10 (*A. mellifera*, *A. pisum*, *B. mori*, *Cx. quinquefasciatus*, *N. vitripennis*, *M. sexta*, *D. erecta*, *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. sechellia*, *D. simulans*, *D. virilis*, *T. castaneum*, *H. melpomene* y *D. yakuba*) (Tabla 12) (Figura 25).

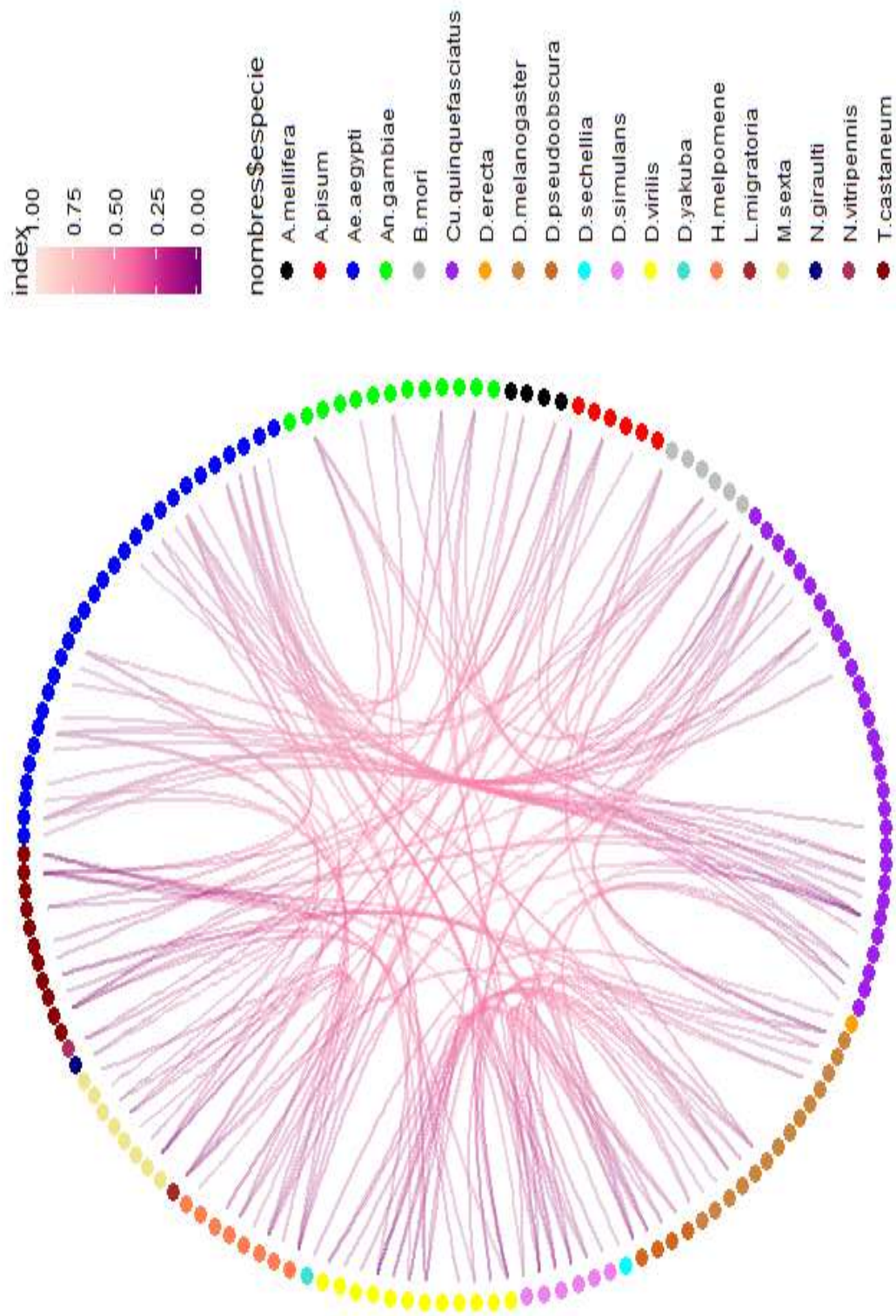


Figura 25. Interacciones (líneas) que presenta cada microRNA predicho (nodos) de acuerdo a su igualdad por su código de clasificación numérica. Cada nodo está coloreado acorde a la especie en la cual fue encontrado el microRNA.

Del total de 54 microRNAs predichos, 29 pertenecieron a organismos del orden Díptera, 11 a Lepidóptera, 6 a Coleóptera, 4 a Himenóptera y 4 a Homóptera (Figura 26).

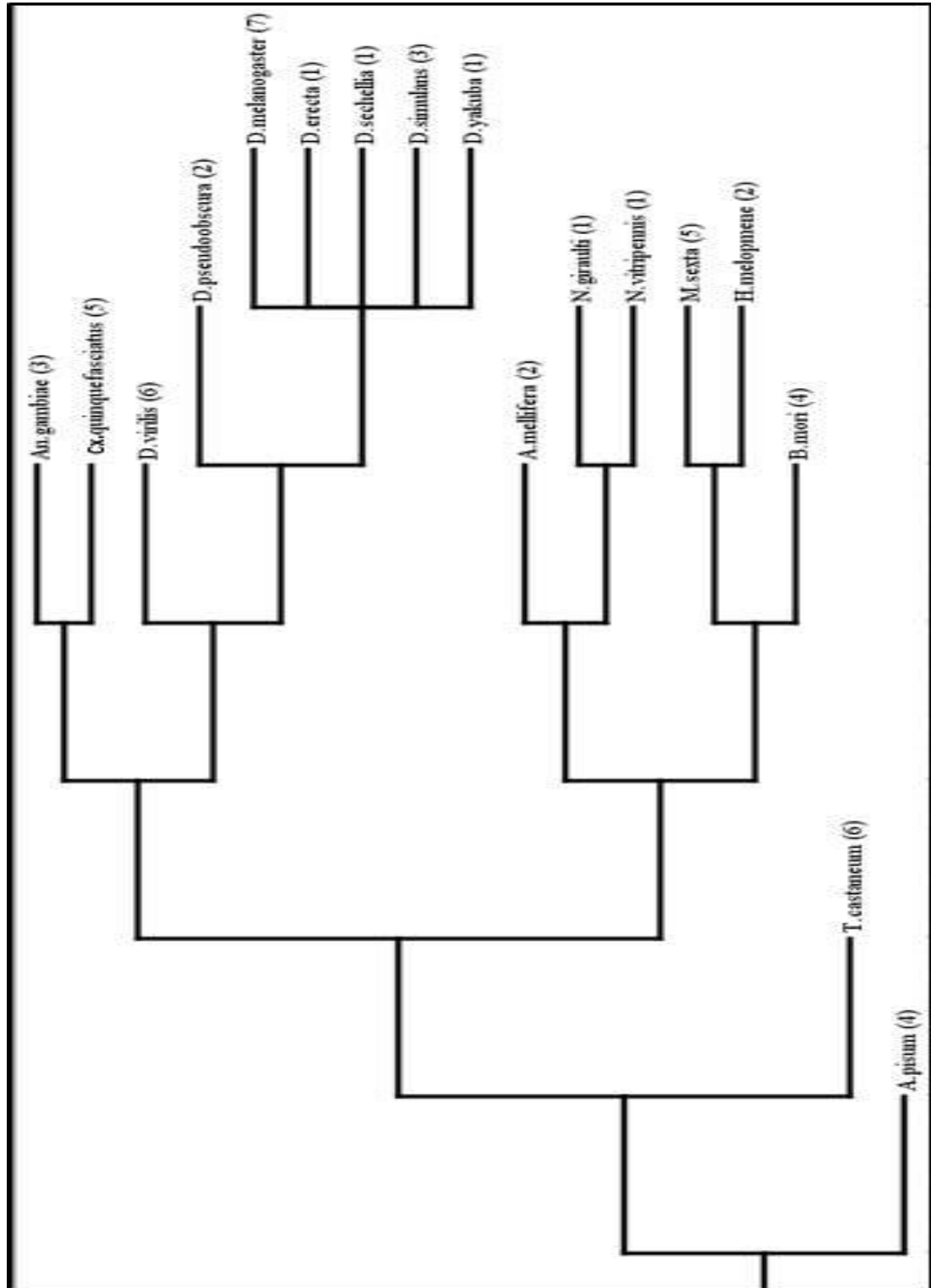


Figura 26. Dendrograma de los organismos donde los microRNAs encontrados *De Novo* en *Ae. aegypti* habían sido previamente reportados.

Dentro del orden más representativo (Díptera) se encontraron un total de 9 especies: 1 perteneciente al género *Anopheles*, 1 al género *Culex* y 7 al género *Drosophila*. De estas especies las que presentaron una mayor cantidad de microRNAs fueron: *Cx. quinquefasciatus*, *D. virilis* y *D. melanogaster* con una cantidad de 5, 6 y 7 microRNAs respectivamente. Otras especies que presentaron mismas cantidades pertenecientes a otros ordenes fueron: *M. sexta* y *T. castaneum* con 5 y 6 microRNAs predichos respectivamente.

8. DISCUSIÓN

Una serie de microRNAs fueron descubiertos en el presente proyecto, estos resultados fueron divididos en diversas baterías tales como *De Novo* para *Ae. aegypti*, conservados entre *Ae. aegypti* y la Clase Insecta, estos a su vez se asociaron a diversos enfoques biológicos tales como distintas etapas de vida (huevos y adultos), sexo (machos y hembras) y la cronología de la alimentación (0, 24, 48 y 72h), a un grupo de estos microRNAs se les ha reportado previamente su RNAm diana y a los que a la fecha no se les ha reportado blanco se les predijo utilizando herramientas bioinformáticas (Figura 27).

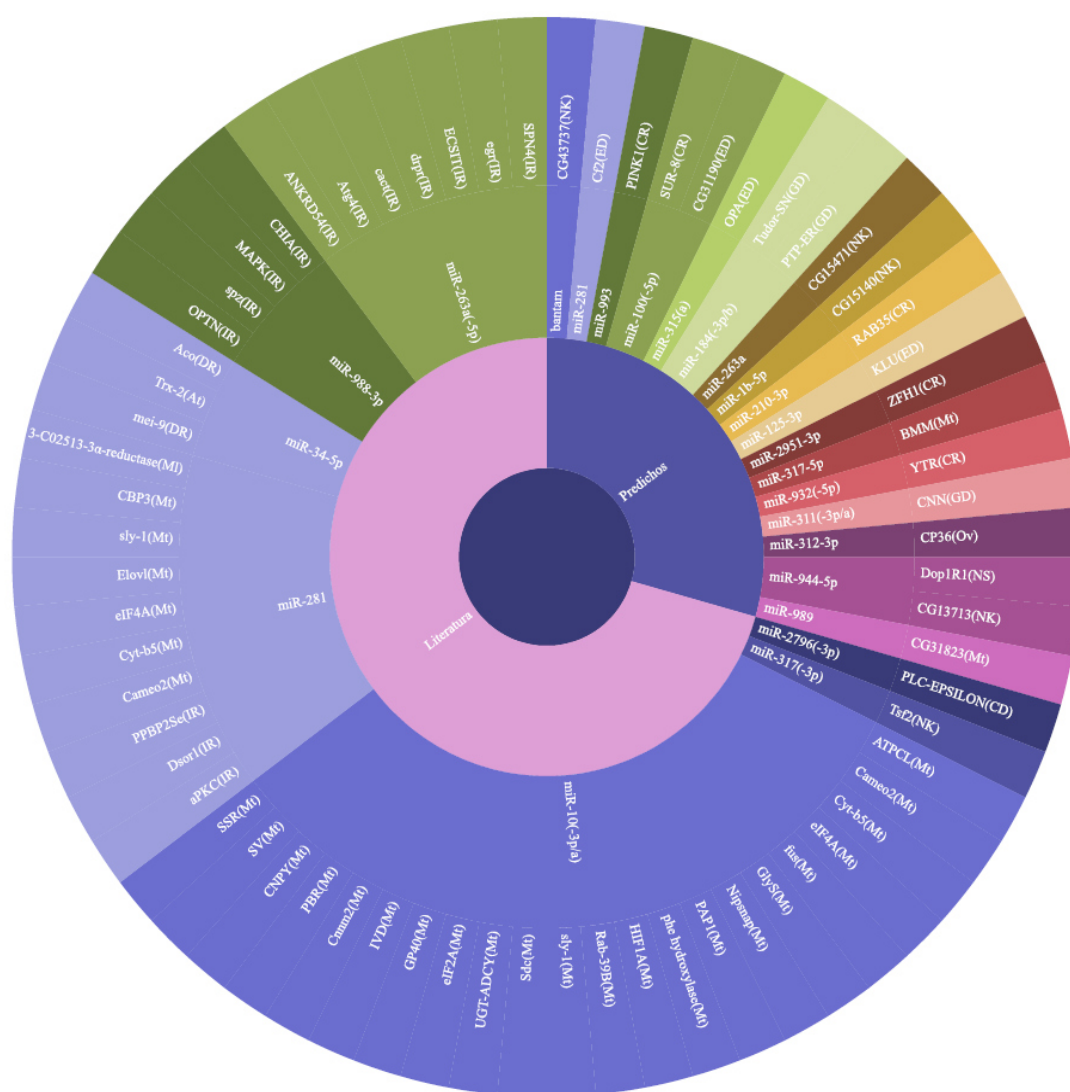


Figura 27. SunBurst de los blancos (confirmados experimentalmente y predichos *In Silico*) de los microRNAs encontrados tanto *De Novo* para *Ae. aegypti* como previamente reportados en organismos de la Clase Insecta.

8.1. microRNAs previamente analizados de manera experimental encontrados en *Ae. aegypti*

Múltiples estudios han reportado la expresión, así como el rol metabólico de microRNAs (Biryukova et al., 2014) en la fisiología de diversos enfoques experimentales específicos de *Ae. aegypti* (principal vector transmisor de patógenos al humano) (Lee, Etebari et al., 2017; W. Liu et al., 2014; Nouzova, Etebari et al., 2018; Spielman, 1971; X. Zhang, Aksoy et al., 2017).

8.1.1. aga-miR-281

La expresión de aga-miR-281 se ha reportado en el intestino de *An. Gambiae* (Biryukova et al., 2014), referente a lo anterior, en nuestros hallazgos se ha identificado la presencia en todos los enfoques experimentales analizados (Winter et al., 2007), por otra parte, el aae-mir-281 no fue encontrado en nuestros resultados, lo que sugiere que el aae-mir-281 no es el ortólogo del aga-miR-281, para llegar a tal conclusión se procedió a realizar un alineamiento de ambos microRNAs observando un 98.83% de homología en su secuencia, sugiriendo una alta presión evolutiva sobre esta región genómica y siendo un nuevo microRNA no descrito para *Ae. aegypti* el ortólogo de aae-mir-281.

8.1.2. miR-989

El miR-989 de *Cx. quinquefasciatus*, *An. gambiae* y *Ae. aegypti* (todos mosquitos del Orden Díptera) (Dantas-Torres et al., 2014) no fue encontrado a las 72 horas post alimentación en nuestros resultados, en *An. gambiae* y *Ae. aegypti* se reportó su expresión en intestino medio (Dennison, BenMarzouk-Hidalgo et al., 2015), expresión en ovarios (Mead y Tu, 2008) y de manera general se reportó su expresión relacionado con wolbachia, en el caso de *Cx. quinquefasciatus* la expresión se detectó en mosquitos infectados por WNV (Osei-Amo et al., 2012). La homología de los microRNAs es del 100%, lo que nos deja deducir que son ortólogos y su función en al menos estos 3 organismos es esencial para la correcta fisiología, pero específica de especie (Lucas et al., 2015).

8.1.3. aae-miR-1890

El aae-miR-1890 no fue encontrado presente en nuestros resultados en hembras alimentadas y sacrificadas a las 72 horas, este microRNA anteriormente había sido relacionado con la regulación de la digestión de sangre humana (Lucas et al., 2015; Mayoral, Hussain et al., 2014; Mead y Tu, 2008), sin embargo, inferimos que el aae-miR-1890 tiene un rol fisiológico distinto y variado pues en nuestros hallazgos también lo encontramos en altos niveles en huevos, machos y hembras sin alimentar.

8.1.4. miR-2940

La expresión de miR-2940 se ha relacionado con la infección por WNV y replicación de wolbachia (Hussain, Frentiu et al., 2011; Slonchak et al., 2014; G. Zhang et al., 2013), en nuestros resultados encontramos la presencia de este microRNA en todos los enfoques experimentales a excepción de hembras alimentadas a las 72 horas.

8.1.5. aae-miR-1174

El aae-miR-1174 se ha reportado que se expresada en el intestino medio, regula funciones intestinales incluida la absorción de azúcar, la excreción de líquidos y la ingesta de sangre (Gu, Hu et al., 2013; S. Li et al., 2009). Este microRNA tiene como blanco el gen Serina hidroximetiltransferasa, los fenotipos causados por el silenciamiento del miR-1174 fueron las funciones anormales del intestino del mosquito. La expresión de aga-miR-1174 también disminuyó en el intestino medio después de la infección por *P. Falciparum* (Dennison et al., 2015). Este microRNA conserva un 95.24% con sus ortólogos ast-miR-1174 y aga-mir-1174 (S. Liu et al., 2014).

8.1.6. aae-miR-375

Existen reportes donde al aae-miR-375 se le adjudican funciones relacionadas con la alimentación sanguínea, la replicación de DENV-2 (Hussain et al., 2013) y la expresión en intestino (Skalsky, Vanlandingham et al., 2010), y el ortólogo en *An. gambiae* (aga-miR-1175) en la infección por *P. Falciparum* (Winter et al., 2007), sin embargo, inferimos que existen otra serie de funciones biológicas relacionadas con este microRNA pues en nuestros hallazgos encontramos expresión en todos los enfoques experimentales.

8.1.7. aae-miR-306-5p

El aae-miR-306-5p se observó apagada en *Ae. aegypti* en la infección con wolbachia (Etebari, Asad et al., 2016; Mayoral, Hussain, et al., 2014) por otro lado el aga-miR-306 se expresó de manera uniforme en todo el cuerpo de *An. Gambiae* (Bryant et al., 2010; Slonchak et al., 2014; Winter et al., 2007) al igual que en nuestros resultados.

8.1.8. ast-miR-14

En nuestros resultados encontramos el microRNA ast-miR-14 presente en todos los enfoques experimentales explorados, al igual que lo previamente publicado para *An. stephensi* donde se reportó señal desde el embrión tardío al estadio adulto (Krishnan, Kumar et al., 2015).

8.1.9. aal-miR-2946

La expresión de aal-miR-2946 (Gu et al., 2013) se detectó en embriones es coherente con los resultados publicados para *Ae. Aegypti* (S. Li et al., 2009). Nosotros encontramos la expresión de aae-miR-2946 en todos los estadios biológicos de explorados.

8.1.10. miR-2943

El miR-2943 fue encontrado en huevos en nuestros resultados, esto coincide con lo previamente publicado para *Ae. Albopictus* (Gu et al., 2013), *Ae. Aegypti* (Hu et al., 2015), *An. Stephensi* (Mead y Tu, 2008) y *An. Gambiae* (Allam, Spillings et al., 2016).

8.1.11. ast-bantam-3p

El microRNA ast-bantam-3p de *An. stephensi* fue el más abundante en las etapas pupa tanto masculina como femenina (Mead y Tu, 2008), y ast-miR-bantam-3p fue el más abundantes en machos y hembras adultos, por otro lado, en *Ae. aegypti* el aae-bantam-5 se reportó sobre expresado en presencia de Wolbachia, en nuestros resultados nosotros encontramos expresión presente en todos los enfoques experimentales aborados.

8.1.12. aae-miR-2765

El aae-miR-2765 de *Ae. aegypti* (previamente reportado) incrementado en infección por *Wolbachia*, en nuestros hallazgos este microRNA lo encontramos presente solamente en machos y hembras (Mayoral, Hussain, et al., 2014) sin alimentar.

8.2. microRNA sobre expresados por condición fisiológica

La discusión de las distintas baterías de microRNAs, tanto *De Novo* para *Ae. aegypti* como los previamente descritos para otros organismos se realizó esquematizando la información por condición fisiológica (embriones, adultos, sexo, alimentación).

8.2.1. Hembras

Se infiere que interferir la transcripción [utilizando RNAs sintéticos de doble cadena (dsRNAs)] de microRNAs específicos de hembras impedirá el desarrollo de características femeninas típicas de *Ae. Aegypti* (Mysore, Sun et al., 2015), por lo que se deduce que al suprimir los microRNAs antes mencionados se expresarán genes con un rol fisiológico en la diferenciación sexual masculina (Y. Zhang et al., 2016), por lo tanto, las hembras se masculinizaras no serán viables para la reproducción sexual, bajando las poblaciones de *Ae. aegypti* hembras y de manera indirecta reduciendo la infección al humano con virus patógenos (Z. Zhou, Li et al., 2015).

8.2.2. Hembras y huevos

Se dedujo que existen microRNAs con un rol fisiológico relacionados en la estirpe femenina de *Ae. aegypti* desde la etapa embrionica. Estos microRNAs resultan ser potencialmente candidatos a ser removidos del genoma y de esta manera se permitirá le expresión de genes no necesarios en las hembras y se infiere que al ocurrir esto la anatomía femenina no será viable para la viabilidad sexual (Y. Zhang et al., 2016).

8.2.3. Embrión

Conocer los microRNAs específicos de huevos (Rosa y Brivanlou, 2017) y ausentes en adultos (tanto en hembras como machos) nos conduce a proponer estrategias de control basado en la inactivación de microRNAs e inhibir la expresión de genes específicos de funciones biológicas de la etapa adulta (o no embriónica) de *Ae. aegypti* y por lo anterior, se promoverá la expresión de genes no necesarios durante la etapa de huevo, aumentando la carga transcripcional, agotando las reservas energéticas y por ende haciendo el embrión infértil, entre otros impactos metabólicos (S. Liu et al., 2014).

8.2.4. Cronología de alimentación

Entre los enfoques experimentales también se exploró determinar microRNAs relacionados con la digestión sanguínea a diferentes horas, esto se hizo a distintos periodos posteriores a la alimentación con sangre humana (0, 24, 48 y 27h). En el 2010 (Bryant et al., 2010) se reportó y evidencio la función del microRNA-275 en el mosquito *Ae. Aegypti* (Bryant et al., 2010), demostrando el rol fundamental que tiene dentro del proceso de digestión sanguínea, excreción de fluidos y el desarrollo de huevos. Dicho lo anterior, los micro RNAs presentes en hembras alimentadas deducidos resultan ser blancos potenciales para ser suprimidos del genoma con un potencial impacto en la digestión sanguínea, por mencionar una (Bryant et al., 2010; S. Liu et al., 2014; Zhao et al., 2017).

8.3. Transcritos blancos previamente reportados de los microRNA

Los transcritos blancos de los microRNAs encontrados con expresión en nuestros distintos enfoques experimentales explorados.

8.3.1. PLC-epsilon

En nuestros resultados fue encontrado, por primera vez para *Ae. aegypti*, el microRNA ortólogo al miR-2796, previamente reportado para ame-miR-2796, bmo-miR-2796-3p, mse-miR-2796, tca-miR-2796-3p, hme-miR-2796), la literatura describe que él ame-miR-2796 tiene como transcrito blanco a la fosfolipasa C-epsilon (PLC-epsilon) regulando de esta manera el desarrollo neuronal para la definición de castas en abejas (Greenberg, Xia et al., 2012). En *Ae. aegypti* este microRNA aparentemente cumple en un rol distinto ya que no existen las castas.

8.3.2. Tsf2

Se ha descrito en literatura que el ame-miR-317 hibrida en el gen de la transferrina 2 (Tsf2) de *Apis mellifera*, más no se ha descrito su función (Qin, Wang et al., 2014). El ortólogo para *Ae. aegypti* fue encontrado *De Novo* en nuestros resultados, mostrando expresión similar (folds) entre machos y hembras (en comparación a huevos), esto da a suponer que éste microRNA cumple un rol de silenciamiento dentro de etapa adulta.

8.3.3. ATP citrate lyase, Cameo2, cytochrome B5, eIF4A, fusilli isoform G, glycogen synthase, NIPSNAP protein, PAP1, Phe hydroxylase, hypoxia inducible factor 1, Ras-related protein rab-39b-like, SLY-1 homolog, syndecan, UDP-glycosyltransferase denylate cyclase, eIF2A, GP40, isovaleryl CoA dehydrogenase, metal transporter CNNM2 like, peripheral-type benzodiazepine receptor, protein canopy like, synaptic vesicle protein, SSR β subunit

Se ha descrito anteriormente que mse-miR-10a (ortólogo a bmo-miR-10-3p, cqu-miR-10-3p, mse-miR-10a, dme-miR-10-3p, dvi-miR-10-3p, tca-miR-10-3p) cumple un rol en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y en la cadena de transporte de electrones dentro de *M. Sexta* (X. Zhang, Zheng et al., 2015), la regulación orquestada por este microRNA fue predicha mediante la interacción con 23 posibles genes: ATP citrate lyase, Cameo2, cytochrome B5, eIF4A, fusilli isoform G, glycogen synthase, NIPSNAP protein, PAP1, Phe hydroxylase, hypoxia inducible factor 1, Ras-related protein rab-39b-like, SLY-1 homolog, syndecan, UDP-glycosyltransferase denylate cyclase, eIF2A, GP40, isovaleryl CoA dehydrogenase, metal transporter CNNM2 like, peripheral-type benzodiazepine receptor, protein canopy like, synaptic vesicle protein, SSR β subunit, Cytochrome b5. En nuestros resultados fue encontrado *De Novo* el ortólogo y con expresión en todas las muestras sin una variación significativa entre ellos, lo cual nos permite inferir una posible función esencial en todas las etapas del mosquito en los procesos metabólicos de lípidos, carbohidratos y en la cadena de transporte de electrones esenciales en el mosquito al igual que lo demostrado experimentalmente en *M. Sexta* (X. Zhang, Zheng et al., 2012).

8.3.4. ANKRD54, Atg4, Cactus, Draper, ECSIT, Eiger, serpin-4

En la literatura a mse-miR-263a se le ha atribuido un rol en la coordinación de respuestas inmunitarias de *M. sexta* mediante la regulación de los genes: ANKRD54, Atg4, Cactus, Draper, ECSIT, Eiger, serpin-4, aunado a lo anterior, también se le ha involucrado en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y el ciclo TCA (X. Zhang et al., 2015). Previamente se han reportado los ortólogos de mse-miR-263^a para mse-miR-263a, dme-miR-263a-5p, dvi-miR-263a-5p, tca-miR-263a-5p, ahora predijimos el ortólogo también para *Ae. aegypti* el cual mostro expresión en todos los enfoques experimentales (Maharaj et al., 2015). Por ende, los resultados demuestran que el microRNA puede ser un regulador de la expresión tanto de genes relacionados a la respuesta inmune como asociados a roles metabólicos en la vida de los mosquitos.

8.3.5. Optineurin, spätzle, MAP-kinase, Chitotriosidase-1

Los microRNAs dme-miR-998-3p y dvi-miR-998-3p son ortólogos y al localizado *De Novo* en *Ae. aegypti* en nuestros resultados. Referente al dme-miR-998-3p la literatura sugiere blancos relacionados a la respuesta inmune, específicamente aquellos genes que orquestan respuestas contra la infección de *L. monocytogenes* como el optineurin, spätzle, MAP-kinase y Chitotriosidase-1 en *D. Melanogaster* (Fritz, Girardin et al., 2006). Los resultados nuestros arrojaron expresión en todas las condiciones fisiológicas exploradas, lo que tiene coherencia al regular su sistema inmune contra posibles infecciones por *L. Monocytogenes* (Ye, Woolfit et al., 2013).

8.3.6. mse-miR-281

El mse-miR-281 de *M. sexta* se desempeña como regulador de la respuesta inmune silenciando los genes aPKC, Dsor1, PPBP2Se, también se infiere un rol en el metabolismo de lípidos, en la cadena de transporte de electrones y el control hormonal para la maduración, específicamente con la muda (X. Zhang et al., 2015), el microRNA inhibe la traducción del gen que codifica por la enzima a *3-hydroecdysone-3 α -reductase* que ésta inactiva hormona *ecdysone* promoviendo la muda, en nuestros resultados encontramos al miR-281 ortólogo (*De Novo* para *Ae. aegypti* solo presente en machos, de esto podemos inferir un rol fisiológico en la promulgación de la madures de *Ae. Aegypti* (Williams, Chen et al., 1997).

8.3.7. Meiotic 9, Thioredoxin-2 y Aconitase

El microRNA *dme-miR-34-5p* se ha reportado como represor de los genes Meiotic 9, Thioredoxin-2 y Aconitase, estos genes están implicados en los fenómenos de reparación de ADN y desintoxicación en *D. Melanogaster* (Chandra, Pandey et al., 2015). Por otra parte, se ha sugerido una función de este mismo microRNA en procesos transcripcionales y de oogenesis en las termitas *Coptotermes formosanus* y *Reticulitermes speratus* (Guo, Su et al., 2013). Estos resultados sugieren que el microRNA podría cumplir funciones moleculares fundamentales en *Ae. aegypti*. El ortólogo del microRNA *miR-34-5p* se encontró *De Novo* en *Ae. aegypti* con expresión constitutiva en todos los enfoques experimentales analizados.

8.4. Predicción de transcritos diana de los microRNAs deducidos

A un conjunto de microRNAs diferencialmente expresados entre las condiciones fisiológicas exploradas se les determinó su posible RNA mensajero blanco para ser interferido y discutido su posible rol fisiológico de manera teórica, para ninguno de estos microRNAs se ha descrito experimentalmente mensajero blanco.

8.4.1. Yantar (small nuclear ribonucleoprotein 27kDa protein)

El microRNA de *Ae. aegypti* ortólogo de *mse-miR-932*, *dps-miR-932-5p*, *dsi-miR-932-5p*, *dvi-miR-932-5p*, *tca-miR-932-5p* y *hme-miR-932*, en nuestros resultados de expresión se encontró solamente expresión en adultos (machos y hembras). Al no haber blancos reportados, únicamente se presentó el blanco predicho *YANTAR* (small nuclear ribonucleoprotein 27kDa protein) como el blanco más probable. Este gen se ha visto involucrado en los procesos básicos de *splicing* en el modelo de *D. Melanogaster* (Sinenko, Kim et al., 2004). Esto indica que el microRNA ortólogo encontrado en *Ae. aegypti* podría desempeñar funciones similares a las reportadas en la mosca en la adultez.

8.4.2. CNN (centrosomin)

En nuestros resultados se encontró *De Novo* un microRNA ortólogo para der-miR-311a, dme-miR-311-3p, dse-miR-311, dsi-miR-311 y dya-miR-311a. A la fecha no se han reportados RNAs mensajeros regulados negativamente por alguno de los anteriores microRNAs mencionados, por lo anterior, se predijo *In Silico* el transcrito diana CNN (centrosomin) como más probable (Vaizel-Ohayon y Schejter, 1999). Este gen se ha visto implicado en el desarrollo embrionario (Feng, Wu et al., 2018) como en la formación de gametos sexuales masculinos. Nuestros resultados mostraron expresión en hembras, esto concuerda con el hecho de la funcionalidad del gen para la formación de gametos masculinos, siendo estos silenciados en las hembras.

8.4.3. Odd paired (zinc fingers)

En nuestros análisis fue localizado De Novo para *Ae. aegypti* un microRNA ortólogo a api-miR-315 y dvi-miR-315a. A la fecha no existe reporte de RNA mensajero blanco a ser regulado por los anteriores microRNAs mencionados, por lo que se procedió a predecible *In Silico* arrojando como resultado al odd paired (zinc fingers) como diana a silenciar. Este gen tiene roles regulatorios en todas las fases de vida de *D. melanogaster*, ya sea en el desarrollo del intestino, la segmentación del embrión, migración de células germinales, etc. En nuestros resultados el microRNA presento expresión en todos los enfoques experimentales explorados, sin diferencias significantes entre ellas, esto sugiere que el blanco es acertado y que el microRNA podría ser capaz de cumplir alguno(s) de estos roles en el ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

8.4.4. CG31823

A la fecha no existía reportado para *Ae. aegypti* microRNA ortólogo a dps-miR-989 y dsi-miR-989, para estos microRNAs no se ha reportado transcrito blanco por lo que se procedió a predecirle uno posible, resultado el CG31823 como el más aceptable a silenciar. Este gen no presenta un producto de traducción, más se ha observado actividad enzimática relacionada a la proteólisis en procesos catabólicos en *D. Melanogaster* (Kahsai y Cook, 2018). En nuestros resultados la expresión del microRNA se encontró en todas las muestras analizadas, lo cual sugiere que este microRNA de igual manera podría presentar un rol en la regulación de esta enzima y por ende un control orquestado en los procesos catabólicos de *Ae. aegypti* durante todas las etapas de vida.

8.4.5. CG43737

El microRNA ortólogo a aga-bantam resulto estar expresado en todos los enfoques experimentales analizados, sin presentar variaciones significativas en la expresión. Sin RNA mensajero reportado regulado por el ortólogo a aga-bantam se procedió inferir *In Silico* uno resultando ser CG43737 el más probable. Este gen no presenta datos acerca de su función o la proteína traducible que expresa, por lo cual no se es posible inferir una relación con los datos realizados.

8.4.6. Cf2 (Chorion factor 2)

El microRNA aga-miR-281 y *De Novo* descubierto para *Ae. aegypti* presentó su expresión en todos los enfoques biológicos analizados. El blanco predicho fue Cf2 (Chorion factor 2), el cual tiene la función de determinar las células foliculares y la expresión de genes miogénicos en el embrión de *D. melanogaster*. Se puede atribuir la misma función en *Ae. aegypti* ya que existe una menor expresión de este microRNA en muestras de huevo en comparación con lo expresado en adultos, lo cual sugiere esta ortología funcional.

8.4.7. Pink1 (PTEN-induced putative kinase 1)

El microRNA aga-miR-993 ortólogo (*De Novo*) para *Ae. aegypti* mostro una expresión específica en muestras de machos y huevos, sin mostrar diferencia significativa de expresión entre estos dos. El blanco predicho para este microRNA fue Pink1 (PTEN-induced putative kinase 1), este gen está encargado de funciones regulatorias metabólicas y celulares en *D. melanogaster*, más recientemente se ha descrito como un gen susceptible a mutaciones, las cuales conducen a la esterilidad por medio de una distribución impar en la citocinesis en machos. Este fenómeno ha sido observado tanto en *D. melanogaster* como en *An. Gambia* (Clark, Dodson et al., 2006). Se puede inferir de esta manera que el rol del microRNA está presente en el proceso de masculinización silenciando la expresión del gen y por consiguiente un polimorfismo en este gen puede estar ligado a una represión deficiente por parte del microRNA y por ende una expresión Pink1 en machos generando su infertilidad.

8.4.8. Sur-8

El microRNA ortólogo a api-miR-100 descubierto *De Novo* en *Ae. aegypti* mostro una expresión específica en adultos (machos y hembras), sin mostrar diferencia significativa de expresión. El blanco predicho para este microRNA fue Sur-8, el producto proteico de este transcrito se ha observado como efector en la activación de la ruta MAPK en *D. melanogaster*. En la literatura se ha descrita a las rutas MAPK como aquellas que regulan procesos celulares importantes como proliferación, apoptosis, respuesta a estrés (Jain, Shrinet et al., 2015) y defensa inmune en organismos eucariontes (Ling et al., 2017; Soares-Silva, Diniz et al., 2016). Los resultados sugieren que el microRNA api-miR-100 cumple un rol en los procesos de distribución y proliferación celular al momento de realizar la madures sexual en mosquitos. Por lo tanto, la expresión del transcrito Sur-8 no es necesaria en la etapa adulta.

8.4.9. Tudor-SN (Tudor staphylococcal nuclease)

El ortólogo de *Ae. aegypti* para el microRNA api-miR-184b mostro una expresión en todas las muestras analizadas. El blanco para este microRNA fue predicho como Tudor-SN [Tudor staphylococcal nuclease (TSN)], este transcrito se expresa en los ovarios y testículos de adultos, TSN se expresa y enriquece de manera ubicua en el citoplasma de las células germinales y somáticas. Los mutantes TSN muestran un índice mitótico más alto de espermatogonia, acumulación de espermatocitos, defectos en la citocinesis meiótica, disminución del número de espermátidas y, eventualmente, reducción de la fertilidad masculina. El análisis de expresión de TSN es específico de la línea germinal. TSN reprime la expresión de Piwi a niveles de proteína y ARNm. Además, reducir la expresión de piwi en la línea germinal rescata el fenotipo TSN mutante de manera dependiente de la dosis, lo que demuestra que Piwi y TSN interactúan de forma antagónica en las células germinales para regular la espermatogénesis. Sin embargo, la deficiencia de TSN tiene poco o ningún impacto en la biogénesis del ARNip pero muestra un efecto sinérgico con los mutantes piwi en el silenciamiento del transposón (Ku, Gangaraju et al., 2016). Estas funciones muestran discordancia con los resultados obtenidos en los cuales este gen está siendo principalmente reprimido en los adultos, lo cual sugiere una función diferente en *Ae. aegypti*.

8.4.10. CG15471

Un microRNA ortólogo a api-miR-263a *De Novo* descubierto para *Ae. aegypti* mostro una expresión específica en muestras de machos y huevos, y estos no presentaron diferencias en sus niveles de expresión. El blanco predicho para este microRNA fue el transcrito CG15471 (Matthews, Dos Santos et al., 2015), a la fecha no se ha descrito su función molecular, se ha observado que su pico de expresión se encuentra en muestras de machos en *D. melanogaster*, por ende, se infiere que el rol de este microRNA como su blanco fungirán un rol completamente diferente en el ciclo de vida de *Ae. Aegypti* (Buist, Steen et al., 2008).

8.4.11. PTP-ER (Protein tyrosine phosphatase-ERK/Enhancer of Ras1)

El ortólogo en *Ae. aegypti* del microRNA bmo-miR-184-3p mostro expresión específica en adultos. El blanco predicho por bioinformática para éste microRNA fue PTP-ER (Protein tyrosine phosphatase-ERK/Enhancer of Ras1), Una proteínas tirosina fosfatasa (PTP) que cataliza la desfosforilación de los péptidos de fosfotirosina; regulando los niveles de fosfotirosina en las vías de transducción de señales, se ha observado que esta enzima regula de manera negativa la cascada de señalización ERK1 y 2, su pico de expresión se ha visto únicamente en huevos de 0 a 6 hrs y una baja en su expresión en hembras, debido a que se ha observado la infertilidad de éstas si el gen se ve expresado. Estos resultados sugieren que el microRNA cumple un rol de silenciamiento de este gen en adultos con el fin de evitar la infertilidad en *Ae. aegypti*.

8.4.12. CG15140

El ácido nucleico de tipo microRNA ortólogo para *Ae. aegypti* del bmo-miR-1b-5p mostro expresión específica en hembras. El blanco predicho para este microRNA fue CG15140 (Anholt y Williams, 2010), al cual no se le ha descrito función. A falta de información acerca del funcionamiento del blanco, se sugiere que este cumpla un rol en los procesos de masculinización de *Ae. aegypti*.

8.4.13. Rab35

El microRNA ortólogo para *cqu-miR-210-3p* en *Ae. aegypti* mostro una expresión en todas las muestras analizadas. El blanco predicho para este microRNA fue Rab35, el cual se ha relacionado a procesos de transporte de vesículas, reciclado endocítico, citocinesis mitótica y secreción exosomal (Xie, Miao et al., 2018). Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito, dejando a *cqu-miR-210-3p* como regulador de los procesos antes mencionados en espacio y tiempo de la vida en *Ae. aegypti*.

8.4.14. Klumpfuss

El ortólogo para *Ae. aegypti* al microRNA *cqu-miR-125-3p* mostro una expresión única en hembras. El blanco predicho para este microRNA fue klumpfuss, este gen se ha visto involucrado en los procesos regulatorios del desarrollo y proliferación de neuroblastos como la especificación de neuronas leucocinergicas abdominales (X. Li, Chen et al., 2013). Se infiere una función completamente distinta en el esquema regulatorio proporcionado por este microRNA en función a otro blanco que presente una mejor relación con una especificidad sexual en hembras.

8.4.15. zfh1 (Zn finger homeodomain 1)

El ortólogo del microRNA *cqu-miR-2951-3p* fue localizado *De Novo* en *Ae. aegypti* mostrando expresión simultánea en todas las muestras biológicas analizadas. El blanco predicho para este microRNA fue zfh1 (Zn finger homeodomain 1), el cual presenta funciones variadas dentro de varios procesos a lo largo de la vida como lo son el desarrollo embrionario, desarrollo de tejidos, diferenciación de hemocitos, desarrollo del sistema inmune, oviposición, etc. (Trono, 2017). Lo anteriormente dicho concuerda con lo obtenido, debido a que, ante la alta variedad de funciones, este gen debe de ser silenciado dentro de ciertos tiempos y tejidos en lapsos de tiempo de la vida del mosquito.

8.4.16. Brummer

El microRNA de *Ae. aegypti* ortólogo a *cqu-miR-317-5p* mostro una expresión similar en todos los enfoques analizadas. El blanco predicho para este microRNA fue *brummer*, este gen cumple su función principal en el metabolismo de triglicéridos como la homeostasis de lípidos en general. En relación a lo antes dicho no se puede relacionar una acción de represión de *cqu-miR-317-5p*, debido a la importancia de este blanco dentro del metabolismo en la vida del mosquito en todo momento.

8.4.17. Cp36 (Chorion protein 36)

El microRNA de *Ae. aegypti* ortólogo de *dme-miR-312-3p* mostro una expresión única en huevos. Para este microRNA se predijo *In Silico* el blanco *Cp36* (Chorion protein 36), el gen que codifica para la proteína compone el eggshell de los huevos a oviponer por la hembra y esta solamente se ve traducida en células foliculares ováricas en hembras (Velentzas, Velentzas et al., 2016). Nuestros resultados sugieren un posible rol represivo en huevos debido a que esta proteína únicamente se ocupa de la función de generar eggshell y no cumple algún rol embrionario. Por otra parte, es desconcertante el hecho de no haber una represión de este gen en machos, por lo que también se infiere un posible rol sexual para estos.

8.4.18. Dop1R1 (Dopamine 1-like receptor 1)

El microRNA *dme-miR-994-5p* (descubierto *De Novo*) mostro una expresión similar dentro de todas las muestras analizadas y sin diferencias significantes entre ellas. El blanco predicho fue *Dop1R1* (Dopamine 1-like receptor 1) con rol en la señalización neuronal (Chen, Liu et al., 2012; Rauschenbach, Karpova et al., 2011).

8.4.19. CG13713

El microRNA *dvi-miR-994-5p* descubierto *De Novo* para *Ae. aegypti* mostro una expresión única en machos. El blanco predicho fue *CG13713*, más de este no ha sido descrito su funcionalidad fisiológica. Se sugiere, a partir de los resultados obtenidos que la funcionalidad del microRNA se ve relacionada a la diferenciación masculina en la etapa de desarrollo de mosquitos adultos (Gross, Guo et al., 2003).

8.4.20. CG31190 (Down syndrome cell adhesion molecule 3)

El microRNA ortólogo en *Ae. aegypti* de tca-miR-100-5p mostro expresión específica en adultos. En la literatura a la fecha no se ha reportado transcrito regulado por el microRNA mencionado con anterioridad por lo que se procedió a predecirle uno utilizando herramientas bioinformáticas dando como resultado el gen CG31190 (Down syndrome cell adhesion molecule 3), en el cual su proteína se ve involucrada en los fenómenos de adhesión de células hemofílicas y el guiamiento de axones (Andrews, Tanglao et al., 2008). Se puede inferir por medio de ello que el rol del microRNA presenta una función en el guiamiento del sistema neuronal en etapas embrionarias en *Ae. aegypti*, debido a que la represión es dada en las etapas adultas de este mismo.

8.5. Transmission vertical

Estudios previos han demostrado que la transferencia del material genético de una especie a otra (transmisión horizontal) puede modular las funciones celulares de la especie receptora. Nachmani D y cols., demostraron que un microRNA de citomegalovirus humano (HCMV) reprime la expresión del ligando de células Natural Killer (NK) (Nachmani, Lankry et al., 2010; L. Zhang, Hou et al., 2012), por su parte, Zhang L et al. 2012, determinaron que los microRNAs del arroz tiene como blanco el gene (LDLRAP1) de humano y ratón (X. Zhang et al., 2012), a la postre, LaMonte G et al. 2012, encontraron que la translocación de microRNAs de eritrocitos inhiben la traducción de genes de *Plasmodium falciparum*, Zhou Z et al. 2015 publicaron que mir-2911, un microRNA de madre selva tiene objetivos directos en el genoma del virus de la Influenza tipo A (Z. Zhou et al., 2015). En la búsqueda de posible transmisión vertical de material genético humano a *Ae. aegypti* se exploró el enfoque experimental de buscar microRNAs humanos previamente reportados en los resultados de secuenciación del miRNoma de *Ae. aegypti*, específicamente en huevos, machos y hembras (sin alimentar), el análisis desplego 10 distintos microRNAs (hsa-let-7g-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-3188, hsa-miR-232, hsa-miR-489-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-451a y hsa-miR-155-3p), a la fecha no se ha reportado de la posible función de estos microRNAs en *Ae. Aegypti* (S. Li et al., 2009).

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta el primer análisis sistemático de la expresión de microRNAs de *Ae. aegypti* durante las distintas etapas de vida (huevos y adultos), sexo (machos y hembras) y la cronología de la alimentación (0, 24, 48 y 72h). Lo anterior atendiendo los objetivos, con lo que nos permitió concluir que la hipótesis planteada [Existen huellas específicas de microRNAs en las distintas etapas biológicas de *Ae. aegypti*] se aceptó. Con lo anterior se abre una batería de opciones para conocer el rol de los microRNAs en la regulación de las funciones fisiológicas críticas tales como los ciclos gonadotrófico que están activados íntimamente por la ingesta de sangre, la transmisión de patógenos estrechamente emparentada a ciclos repetidos de alimentación obligatoria de sangre y maduración del huevo, la comprensión de los mecanismos orquestados por lo microRNAs que rigen la producción de huevos, el perfil mirnómico que coordina la diferenciación sexual de *Ae. aegypti* y los microRNAs específicos de *Ae. aegypti* y los conservados con otros animales (insectos y no insectos).

Aunado a lo anterior, ahora conocemos que existe transmisión vertical de microRNAs humanos ingeridos por hembras a los huevos ovipuestos y estos a su vez están presentes en la primera generación de machos, una vez plenamente comprendido el rol de este material genético transferido de manera vertical se puede reestructurar el paradigma biológico, por lo tanto, ahora sabemos que así como hay una regulación transcriptómica por microRNAs provenientes de un reino sobre otro, ahora sabemos que existe la regulación transcripcional entre diferentes órdenes del mismo reino manipulada por microRNAs.

10. PERSPECTIVAS

Los hallazgos inéditos generados en el presente trabajo proporcionan información con alto impacto en la propuesta y generación de nuevas estrategias de control de *Ae. aegypti* con la particularidad de ser ecológicamente sustentables y especie dirigidas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Allam, M., Spillings, B. L., Abdalla, H., Mapiye, D., Koekemoer, L. L., & Christoffels, A. (2016). Identification and characterization of microRNAs expressed in the African malaria vector *Anopheles funestus* life stages using high throughput sequencing. *Malar J*, 15(1), 542. doi:10.1186/s12936-016-1591-0
- Andrews, G. L., Tanglao, S., Farmer, W. T., Morin, S., Brotman, S., Berberoglu, M. A., Kidd, T. (2008). Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and - independent functions. *Development*, 135(23), 3839-3848. doi:10.1242/dev.023739
- Anholt, R. R., & Williams, T. I. (2010). The soluble proteome of the *Drosophila* antenna. *Chem Senses*, 35(1), 21-30. doi:10.1093/chemse/bjp073
- Biryukova, I., Ye, T., & Levashina, E. (2014). Transcriptome-wide analysis of microRNA expression in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 15, 557. doi:10.1186/1471-2164-15-557
- Bryant, B., Macdonald, W., & Raikhel, A. S. (2010). microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(52), 22391-22398. doi:10.1073/pnas.1016230107
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol*, 68(4), 838-847. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x
- Chandra, S., Pandey, A., & Chowdhuri, D. K. (2015). MiRNA profiling provides insights on adverse effects of Cr(VI) in the midgut tissues of *Drosophila melanogaster*. *J Hazard Mater*, 283, 558-567. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.09.054
- Chen, B., Liu, H., Ren, J., & Guo, A. (2012). Mutation of *Drosophila* dopamine receptor DopR leads to male-male courtship behavior. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(3), 557-563. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.003
- Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Guo, M. (2006). *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441(7097), 1162-1166. doi:10.1038/nature04779
- Csardi, G., Kutalik, Z., & Bergmann, S. (2010). Modular analysis of gene expression data with R. *Bioinformatics*, 26(10), 1376-1377. doi:10.1093/bioinformatics/btq130
- Dantas-Torres, F., Cameron, M. M., Colwell, D. D., & Otranto, D. (2014). A look into the Medical and Veterinary Entomology crystal ball. *Med Vet Entomol*, 28 Suppl 1, 6-13. doi:10.1111/mve.12066

- Dennison, N. J., BenMarzouk-Hidalgo, O. J., & Dimopoulos, G. (2015). MicroRNA-regulation of *Anopheles gambiae* immunity to *Plasmodium falciparum* infection and midgut microbiota. *Dev Comp Immunol*, 49(1), 170-178.
doi:10.1016/j.dci.2014.10.016
- Dessau, R. B., & Pipper, C. B. (2008). ["R"--project for statistical computing]. *Ugeskr Laeger*, 170(5), 328-330.
- Dritsou, V., Deligianni, E., Dialynas, E., Allen, J., Poulakakis, N., Louis, C., Topalis, P. (2014). Non-coding RNA gene families in the genomes of anopheline mosquitoes. *BMC Genomics*, 15, 1038. doi:10.1186/1471-2164-15-1038
- Dubey, S. K., Shrinet, J., Jain, J., Ali, S., & Sunil, S. (2017). *Aedes aegypti* microRNA miR-2b regulates ubiquitin-related modifier to control chikungunya virus replication. *Sci Rep*, 7(1), 17666. doi:10.1038/s41598-017-18043-0
- Etebari, K., Asad, S., Zhang, G., & Asgari, S. (2016). Identification of *Aedes aegypti* Long Intergenic Non-coding RNAs and Their Association with *Wolbachia* and Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(10), e0005069.
doi:10.1371/journal.pntd.0005069
- Feng, X., Wu, J., Zhou, S., Wang, J., & Hu, W. (2018). Characterization and potential role of microRNA in the Chinese dominant malaria mosquito *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) throughout four different life stages. *Cell Biosci*, 8, 29.
doi:10.1186/s13578-018-0227-1
- Feng, X., Zhou, S., Wang, J., & Hu, W. (2018). microRNA profiles and functions in mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5), e0006463.
doi:10.1371/journal.pntd.0006463
- Fritz, J. H., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2006). Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE*, 2006(339), pe27. doi:10.1126/stke.3392006pe27
- Greenberg, J. K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S. R., Gu, X., Ament, S. A., Ben-Shahar, Y. (2012). Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes Brain Behav*, 11(6), 660-670. doi:10.1111/j.1601-183X.2012.00782.x
- Gross, S. P., Guo, Y., Martinez, J. E., & Welte, M. A. (2003). A determinant for directionality of organelle transport in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 13(19), 1660-1668.

- Gu, J., Hu, W., Wu, J., Zheng, P., Chen, M., James, A. A., Tu, Z. (2013). miRNA genes of an invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One*, 8(7), e67638. doi:10.1371/journal.pone.0067638
- Guo, X., Su, S., Skogerboe, G., Dai, S., Li, W., Li, Z., Chen, R. (2013). Recipe for a busy bee: microRNAs in Honey Bee caste determination. *PLoS One*, 8(12), e81661. doi:10.1371/journal.pone.0081661
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Hoffman, S. L. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591), 129-149. doi:10.1126/science.1076181
- Hu, W., Criscione, F., Liang, S., & Tu, Z. (2015). MicroRNAs of two medically important mosquito species: *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Insect Mol Biol*, 24(2), 240-252. doi:10.1111/imb.12152
- Hussain, M., & Asgari, S. (2014). MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(7), 2746-2751. doi:10.1073/pnas.1320123111
- Hussain, M., Frentiu, F. D., Moreira, L. A., O'Neill, S. L., & Asgari, S. (2011). Wolbachia uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9250-9255. doi:10.1073/pnas.1105469108
- Hussain, M., Walker, T., O'Neill, S. L., & Asgari, S. (2013). Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 43(2), 146-152. doi:10.1016/j.ibmb.2012.11.005
- Isci, S., Dogan, H., Ozturk, C., & Otu, H. H. (2014). Bayesian network prior: network analysis of biological data using external knowledge. *Bioinformatics*, 30(6), 860-867. doi:10.1093/bioinformatics/btt643
- Jain, S., Rana, V., Shrinet, J., Sharma, A., Tridibes, A., Sunil, S., & Bhatnagar, R. K. (2014). Blood feeding and Plasmodium infection alters the miRNome of *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, 9(5), e98402. doi:10.1371/journal.pone.0098402
- Jain, S., Rana, V., Tridibes, A., Sunil, S., & Bhatnagar, R. K. (2015). Dynamic expression of miRNAs across immature and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors*, 8, 179. doi:10.1186/s13071-015-0772-y
- Jain, S., Shrinet, J., Tridibes, A., Bhatnagar, R. K., & Sunil, S. (2015). miRNA(-)mRNA Conflux Regulating Immunity and Oxidative Stress Pathways in the Midgut of

- Blood-Fed *Anopheles stephensi*. *Noncoding RNA*, 1(3), 222-245.
doi:10.3390/ncrna1030222
- Kahsai, L., & Cook, K. R. (2018). Mapping Second Chromosome Mutations to Defined Genomic Regions in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)*, 8(1), 9-16.
doi:10.1534/g3.117.300289
- Krishnan, R., Kumar, V., Ananth, V., Singh, S., Nair, A. S., & Dhar, P. K. (2015). Computational identification of novel microRNAs and their targets in the malarial vector, *Anopheles stephensi*. *Syst Synth Biol*, 9(1-2), 11-17. doi:10.1007/s11693-014-9159-1
- Ku, H. Y., Gangaraju, V. K., Qi, H., Liu, N., & Lin, H. (2016). Tudor-SN Interacts with Piwi Antagonistically in Regulating Spermatogenesis but Synergistically in Silencing Transposons in *Drosophila*. *PLoS Genet*, 12(1), e1005813.
doi:10.1371/journal.pgen.1005813
- LaMonte, G., Philip, N., Reardon, J., Lacsina, J. R., Majoros, W., Chapman, L., Chi, J. T. (2012). Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microbe*, 12(2), 187-199. doi:10.1016/j.chom.2012.06.007
- Lee, M., Etebari, K., Hall-Mendelin, S., van den Hurk, A. F., Hobson-Peters, J., Vatipally, S., Asgari, S. (2017). Understanding the role of microRNAs in the interaction of *Aedes aegypti* mosquitoes with an insect-specific flavivirus. *J Gen Virol*, 98(7), 1892-1903. doi:10.1099/jgv.0.000832
- Lei, Z., Lv, Y., Wang, W., Guo, Q., Zou, F., Hu, S., Zhu, C. (2015). MiR-278-3p regulates pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitol Res*, 114(2), 699-706.
doi:10.1007/s00436-014-4236-7
- Li, S., Mead, E. A., Liang, S., & Tu, Z. (2009). Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. *BMC Genomics*, 10, 581. doi:10.1186/1471-2164-10-581
- Li, X., Chen, Z., & Desplan, C. (2013). Temporal patterning of neural progenitors in *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol*, 105, 69-96. doi:10.1016/B978-0-12-396968-2.00003-8
- Ling, L., Kokoza, V. A., Zhang, C., Aksoy, E., & Raikhel, A. S. (2017). MicroRNA-277 targets insulin-like peptides 7 and 8 to control lipid metabolism and reproduction in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(38), E8017-E8024.
doi:10.1073/pnas.1710970114

- Liu, S., Lucas, K. J., Roy, S., Ha, J., & Raikhel, A. S. (2014). Mosquito-specific microRNA-1174 targets serine hydroxymethyltransferase to control key functions in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(40), 14460-14465. doi:10.1073/pnas.1416278111
- Liu, W., Hao, Z., Huang, L., Chen, L., Wei, Q., Cai, L., & Liang, S. (2017). Comparative expression profile of microRNAs in *Anopheles anthropophagus* midgut after blood-feeding and *Plasmodium* infection. *Parasit Vectors*, *10*(1), 86. doi:10.1186/s13071-017-2027-6
- Liu, W., Huang, H., Xing, C., Li, C., Tan, F., & Liang, S. (2014). Identification and characterization of the expression profile of microRNAs in *Anopheles anthropophagus*. *Parasit Vectors*, *7*, 159. doi:10.1186/1756-3305-7-159
- Lucas, K. J., Zhao, B., Roy, S., Gervaise, A. L., & Raikhel, A. S. (2015). Mosquito-specific microRNA-1890 targets the juvenile hormone-regulated serine protease JHA15 in the female mosquito gut. *RNA Biol*, *12*(12), 1383-1390. doi:10.1080/15476286.2015.1101525
- Maddison, D. R., Swofford, D. L., & Maddison, W. P. (1997). NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Syst Biol*, *46*(4), 590-621.
- Maharaj, P. D., Widen, S. G., Huang, J., Wood, T. G., & Thangamani, S. (2015). Discovery of mosquito saliva microRNAs during CHIKV infection. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(1), e0003386. doi:10.1371/journal.pntd.0003386
- Matthews, B. B., Dos Santos, G., Crosby, M. A., Emmert, D. B., St Pierre, S. E., Gramates, L. S., FlyBase, C. (2015). Gene Model Annotations for *Drosophila melanogaster*: Impact of High-Throughput Data. *G3 (Bethesda)*, *5*(8), 1721-1736. doi:10.1534/g3.115.018929
- Mayoral, J. G., Etebari, K., Hussain, M., Khromykh, A. A., & Asgari, S. (2014). Wolbachia infection modifies the profile, shuttling and structure of microRNAs in a mosquito cell line. *PLoS One*, *9*(4), e96107. doi:10.1371/journal.pone.0096107
- Mayoral, J. G., Hussain, M., Joubert, D. A., Iturbe-Ormaetxe, I., O'Neill, S. L., & Asgari, S. (2014). Wolbachia small noncoding RNAs and their role in cross-kingdom communications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(52), 18721-18726. doi:10.1073/pnas.1420131112
- Mead, E. A., & Tu, Z. (2008). Cloning, characterization, and expression of microRNAs from the Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. *BMC Genomics*, *9*, 244. doi:10.1186/1471-2164-9-244

- Mysore, K., Sun, L., Tomchaney, M., Sullivan, G., Adams, H., Piscoya, A. S., Duman-Scheel, M. (2015). siRNA-Mediated Silencing of doublesex during Female Development of the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(11), e0004213. doi:10.1371/journal.pntd.0004213
- Nachmani, D., Lankry, D., Wolf, D. G., & Mandelboim, O. (2010). The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nat Immunol*, 11(9), 806-813. doi:10.1038/ni.1916
- Nouzova, M., Etebari, K., Noriega, F. G., & Asgari, S. (2018). A comparative analysis of corpora allata-corpora cardiaca microRNA repertoires revealed significant changes during mosquito metamorphosis. *Insect Biochem Mol Biol*, 96, 10-18. doi:10.1016/j.ibmb.2018.03.007
- OMS. (2018). Enfermedades transmitidas por vectores. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Osei-Amo, S., Hussain, M., O'Neill, S. L., & Asgari, S. (2012). Wolbachia-induced aae-miR-12 miRNA negatively regulates the expression of MCT1 and MCM6 genes in Wolbachia-infected mosquito cell line. *PLoS One*, 7(11), e50049. doi:10.1371/journal.pone.0050049
- Puthiyakunnon, S., Yao, Y., Li, Y., Gu, J., Peng, H., & Chen, X. (2013). Functional characterization of three MicroRNAs of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*, 6(1), 230. doi:10.1186/1756-3305-6-230
- Qin, Q. H., Wang, Z. L., Tian, L. Q., Gan, H. Y., Zhang, S. W., & Zeng, Z. J. (2014). The integrative analysis of microRNA and mRNA expression in *Apis mellifera* following maze-based visual pattern learning. *Insect Sci*, 21(5), 619-636. doi:10.1111/1744-7917.12065
- Ramasamy, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., & Naik, V. G. (2014). STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *Springerplus*, 3, 431. doi:10.1186/2193-1801-3-431
- Rauschenbach, I. Y., Karpova, E. K., Bogomolova, E. V., Laukhina, O. V., & Gruntenko, N. E. (2011). Juvenile hormone synthesis is stimulated by activation of dopamine D1-like receptors in *Drosophila*. *Dokl Biochem Biophys*, 441, 273-275. doi:10.1134/S1607672911060081

- Riemondy, K. A., Sheridan, R. M., Gillen, A., Yu, Y., Bennett, C. G., & Hesselberth, J. R. (2017). valr: Reproducible genome interval analysis in R. *F1000Res*, 6, 1025. doi:10.12688/f1000research.11997.1
- Rosa, A., & Brivanlou, A. H. (2017). Role of MicroRNAs in Zygotic Genome Activation: Modulation of mRNA During Embryogenesis. *Methods Mol Biol*, 1605, 31-43. doi:10.1007/978-1-4939-6988-3_3
- Sinenko, S. A., Kim, E. K., Wynn, R., Manfrulli, P., Ando, I., Wharton, K. A., Mathey-Prevot, B. (2004). Yantar, a conserved arginine-rich protein is involved in *Drosophila* hemocyte development. *Dev Biol*, 273(1), 48-62. doi:10.1016/j.ydbio.2004.05.022
- Skalsky, R. L., Vanlandingham, D. L., Scholle, F., Higgs, S., & Cullen, B. R. (2010). Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics*, 11, 119. doi:10.1186/1471-2164-11-119
- Slonchak, A., Hussain, M., Torres, S., Asgari, S., & Khromykh, A. A. (2014). Expression of mosquito microRNA Aae-miR-2940-5p is downregulated in response to West Nile virus infection to restrict viral replication. *J Virol*, 88(15), 8457-8467. doi:10.1128/JVI.00317-14
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N., & Bahia, D. (2016). The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Front Microbiol*, 7, 183. doi:10.3389/fmicb.2016.00183
- Spielman, A. (1971). Bionomics of autogenous mosquitoes. *Annu Rev Entomol*, 16, 231-248. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001311
- Talaga, S., Muriene, J., Dejean, A., & Leroy, C. (2015). Online database for mosquito (Diptera, Culicidae) occurrence records in French Guiana. *Zookeys*(532), 107-115. doi:10.3897/zookeys.532.6176
- Trono, D. (2017). A KRABsody for Embryo-Placental Development. *Dev Cell*, 41(6), 578-580. doi:10.1016/j.devcel.2017.06.005
- Vaizel-Ohayon, D., & Schejter, E. D. (1999). Mutations in centrosomin reveal requirements for centrosomal function during early *Drosophila* embryogenesis. *Curr Biol*, 9(16), 889-898.
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Garfield, M. K., & Ribeiro, J. M. (2003). Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*, 33(7), 717-732.

- Velentzas, A. D., Velentzas, P. D., Sagioglou, N. E., Konstantakou, E. G., Anagnostopoulos, A. K., Tsioka, M. M., Stravopodis, D. J. (2016). Targeted Downregulation of s36 Protein Unearths its Cardinal Role in Chorion Biogenesis and Architecture during *Drosophila melanogaster* Oogenesis. *Sci Rep*, 6, 35511. doi:10.1038/srep35511
- Williams, D. R., Chen, J. H., Fisher, M. J., & Rees, H. H. (1997). Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) inactivation by ecdysteroids and an agonist, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine (RH-5849). *J Biol Chem*, 272(13), 8427-8432.
- Winter, F., Edaye, S., Huttenhofer, A., & Brunel, C. (2007). *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defence reaction against Plasmodium invasion. *Nucleic Acids Res*, 35(20), 6953-6962. doi:10.1093/nar/gkm686
- Wu, Y., Xie, L., Liu, P., Li, X., Yan, G., & Chen, X. (2015). [Omics of vector mosquitoes: a big data platform for vector biology and vector-borne diseases]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 35(5), 625-630.
- Xie, Y., Miao, H., & Blankenship, J. T. (2018). Membrane trafficking in morphogenesis and planar polarity. *Traffic*. doi:10.1111/tra.12580
- Yan, H., Zhou, Y., Liu, Y., Deng, Y., & Chen, X. (2014). miR-252 of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* regulates dengue virus replication by suppressing the expression of the dengue virus envelope protein. *J Med Virol*, 86(8), 1428-1436.
- Ye, Y. H., Woolfit, M., Rances, E., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Wolbachia-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), e2362. doi:10.1371/journal.pntd.0002362
- Zhang, G., Hussain, M., O'Neill, S. L., & Asgari, S. (2013). Wolbachia uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(25), 10276-10281. doi:10.1073/pnas.1303603110
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 22(1), 107-126. doi:10.1038/cr.2011.158
- Zhang, X., Aksoy, E., Girke, T., Raikhel, A. S., & Karginov, F. V. (2017). Transcriptome-wide microRNA and target dynamics in the fat body during the gonadotrophic cycle of *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(10), E1895-E1903. doi:10.1073/pnas.1701474114

- Zhang, X., Zheng, Y., Cao, X., Ren, R., Yu, X. Q., & Jiang, H. (2015). Identification and profiling of *Manduca sexta* microRNAs and their possible roles in regulating specific transcripts in fat body, hemocytes, and midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, 62, 11-22. doi:10.1016/j.ibmb.2014.08.006
- Zhang, X., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Ren, R., Sunkar, R., & Jiang, H. (2012). Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 42(6), 381-395. doi:10.1016/j.ibmb.2012.01.006
- Zhang, Y., Zhao, B., Roy, S., Saha, T. T., Kokoza, V. A., Li, M., & Raikhel, A. S. (2016). microRNA-309 targets the Homeobox gene SIX4 and controls ovarian development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(33), E4828-4836. doi:10.1073/pnas.1609792113
- Zhao, B., Lucas, K. J., Saha, T. T., Ha, J., Ling, L., Kokoza, V. A., Raikhel, A. S. (2017). MicroRNA-275 targets sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase (SERCA) to control key functions in the mosquito gut. *PLoS Genet*, 13(8), e1006943. doi:10.1371/journal.pgen.1006943
- Zhou, Y., Liu, Y., Yan, H., Li, Y., Zhang, H., Xu, J., Chen, X. (2014). miR-281, an abundant midgut-specific miRNA of the vector mosquito *Aedes albopictus* enhances dengue virus replication. *Parasit Vectors*, 7, 488. doi:10.1186/s13071-014-0488-4
- Zhou, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Liu, J., Zhang, C. Y. (2015). Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res*, 25(1), 39-49. doi:10.1038/cr.2014.130

RESUMEN BIOGRÁFICO

Iram Pablo Rodríguez Sánchez

Candidato para en Grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Entomología Medica

Tesis: MIRNOMICA DE DISTINTOS ENFOQUES BIOLÓGICOS DE *Aedes aegypti* (L) (DIPTERA: CULICIDAE)

Campo de Estudio: Entomología Medica

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 30 de enero de 1980, hijo de Armando Rodriguez Mercado y Silvia Ruth Sanchez Sanmiguel.

Educación: Egresado de la licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo y maestro en ciencias con acentuación en Entomología Medica, ambas por la FCB de la UANL.

Experiencia Profesional: Profesional no Docente en la FCB de la UANL desde el 2013.

Este documento fue tecleado en su totalidad por el autor y la redacción fue revisada y autorizada para su impresión por cada uno de los profesores involucrados.

